

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

НЕФЬОДОВ ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 616.832-004-092.9:615.212.3:615.279:615.07

**ФАРМАКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ
НЕЙРОПРОТЕКЦІЇ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ**

14.03.05 – фармакологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі фармакології і клінічної фармакології Державного закладу «Дніпропетровська медична академія Міністерства охорони здоров'я України»

Науковий консультант: доктор медичних наук, професор **МАМЧУР Віталій Йосипович**, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро, професор кафедри фармакології і клінічної фармакології

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор **БЄЛЕНІЧЕВ Ігор Федорович**, Запорізький державний медичний університет, м. Запоріжжя, завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури;

доктор медичних наук, професор **ВОЛОЩУК Наталія Іванівна**, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, м. Вінниця, завідувач кафедри фармакології;

доктор медичних наук, професор **КУЛЬЧИЦЬКИЙ Олег Костянтинович**, ДУ «Інститут геронтології ім. академіка Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», завідувач лабораторії регуляції метаболізму.

Захист відбудеться «15» листопада 2017 року об 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Е.Потьє, 14.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Е.Потьє, 14.

Автореферат розісланий « » _____ 2017 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01
кандидат біологічних наук



І.В. Данова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В структурі сучасної неврологічної патології одне з провідних місць займають нейродегенеративні захворювання [Шмидт Т.Е. и соавт., 2016; McRoberts W.P. et al., 2013]. Як зазначається рядом дослідників [Helwick C. et al., 2016; Міщенко Т.С. та ін., 2014; Malik O. et al., 2014], найбільш поширеною патологією нейродегенеративного характеру, що вражає переважно людей молодого працездатного віку (16-45 років) та швидко приводить до інвалідизації, є розсіяний склероз (РС) – хронічне аутоімунне захворювання, при якому ушкоджується мієлінова оболонка нервових волокон головного і спинного мозку. Особливістю хвороби є одночасне ураження кількох різних відділів нервової системи, що призводить до появи у хворих різноманітних неврологічних симптомів. Морфологічною основою хвороби є утворення так званих бляшок розсіяного склерозу – осередків руйнування мієліну (дем'єлінізація) білої речовини головного та спинного мозку [Киселева Е.В. и соавт., 2015; Popescu B.F. et al., 2014].

Здобутки клінічної та експериментальної медицини останніх років дозволили з'ясувати механізми розвитку цієї патології, виділити нові нозологічні форми, розробити їх діагностичні критерії та вдосконалити фармакотерапію [Morrison J.D. et al., 2016; Nylander A. et al., 2012]. Діагностика нейродегенеративних захворювань на ранніх етапах і використання сучасних лікарських засобів дозволяє впливати на прогноз перебігу хвороби та істотно поліпшити якість життя хворих.

Водночас на сьогодні у хворих на РС все більшої актуальності набуває проблема больового синдрому. Роботи останніх років свідчать про те, що не менше 2/3 пацієнтів із РС (від 50 до 80 %) в тій чи іншій мірі страждають від болю, при цьому не менше 40 % з них характеризують його як постійний [Власов Я.В. и соавт., 2015; Федосєєв С.В., 2012; Агаф'їна А.С. и соавт., 2012]. Біль при розсіяному склерозі може проявлятися у вигляді соматичних ноцицептивних синдромів, пов'язаних із м'язово-скелетним та хронічним болем, або ж невропатичного (дизестезичного чи трункального) болю [Завалишин І.А., 2014].

В терапії ноцицептивних больових синдромів при РС активно застосовують нестероїдні протизапальні препарати, з метою зменшення побічних ефектів яких (ульцерогенна дія, підвищення рівня глікемії тощо) рекомендовано, насамперед, використання селективних блокаторів циклооксигенази 2 типу [Власов Я.В. и соавт., 2015; Агаф'їна А.С. и соавт., 2008]. Водночас в терапії невропатичних больових синдромів при РС високу терапевтичну ефективність виявляють так звані ад'ювантні знеболюючі засоби – антиконвульсанти [Banerjee M. et al., 2013; Агаф'їна А.С. и соавт., 2012; Dworkin R.H. et al., 2007] та антидепресанти [Тарасова С.В. и соавт., 2008; Crussu G. et al., 2007].

Однак всіма дослідниками проблеми больового синдрому при РС наголошується, що натеper немає єдиної думки на причини виникнення, механізми розвитку, згідно з віком, статтю, тяжкістю хвороби [Завалишин І.А., 2014; Агаф'їна А.С. и соавт., 2004; Chatel M. et al., 2001]. Досі залишаються дискусійними питання співвідношення болю і клінічних особливостей РС [Власов Я.В. и соавт., 2015; Агаф'їна А.С. и соавт., 2004; Archibald C. J. et al., 1994].

До того ж, на сьогодні не існує єдиної систематизації больових синдромів при розсіяному склерозі, а також не висвітлені питання їх інформаційно-структурного аналізу.

У доступній нам літературі знайдено лише поодинокі повідомлення про можливий початок розсіяного склерозу з больового синдрому. Біль, як симптом дебюту, описують від 8 до 21% випадків [Федосєєв С.В., 2012; Власов Я.В. и соавт., 2015]. Не виявлено жодного дослідження, спеціально присвяченого аналізу больового дебюту, можливості прогнозування перебігу захворювання в залежності від виду больового синдрому, який сформувався на початку хвороби.

Ефективна терапія больового синдрому при розсіяному склерозі в даний час також є актуальним і в повному обсязі невирішеним завданням. Проведені в Данії дослідження показали, що повноцінну знеболюючу терапію отримують тільки 42% хворих РС [Агафьина А.С. и соавт., 2004; Haviv Y. et al., 2015].

Водночас нейродегенеративний характер захворювання дає підставу для раннього початку проведення нейропротективної терапії, яка «розшиватиме» найбільш «вузькі місця» нейропротективного та антиоксидантного захисту. Нейропротекція при розсіяному склерозі повинна забезпечити профілактику нейроапоптозу, підтримку нервових та гліальних клітин, які гинуть, а також регенерацію ушкоджень та представляється як універсальний терапевтичний підхід в регуляції балансу імунних і нейротрофічних факторів за даної патології [Шмидт Т.Е. и соавт., 2016; Евтушенко С.К. и соавт., 2014; Соколова Л.І. та ін., 2012].

Відносною, наближеною моделлю демієлінізуючих захворювань людини (в т.ч. розсіяного склерозу) є відтворюваний в лабораторних умовах експериментальний алергічний енцефаломієліт (ЕАЕ). Однак біохімічні, імунологічні та морфологічні зміни при ЕАЕ мають принципову схожість з аналогічними змінами, що супроводжують аутоімунні демієлінізуючі ураження нервової системи в клініці, що дає підставу вважати експериментальний алергічний енцефаломієліт адекватною та оптимальною моделлю, яка дозволяє суттєво розширити межі досліджень питань етіології, патогенезу, терапії та профілактики демієлінізуючих захворювань [Абдурасулова И.Н. и соавт., 2007; Degano A.L. et al., 2000].

Все вищевказане визначає наукову та практичну значимість поглиблених порівняльних фармакодинамічних та фармакокінетичних досліджень використання знеболюючих та нейропротекторних засобів за умов базової гормонотерапії розсіяного склерозу, що може слугувати теоретичними передумовами оптимізації фармакотерапії больового синдрому та медикаментозного захисту мозку у хворих на розсіяний склероз.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт кафедри фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» та є фрагментом НДР: «Експериментально-теоретичне обґрунтування особливостей знеболювальної та нейропротекторної медикаментозної терапії в умовах модельованої патології» (№ держреєстрації 0104U006269), «Системна фармакологія

неопіодних анальгетиків та засобів медикаментозного захисту мозку в умовах патологічних станів» (№ держреєстрації 0114U000935).

Мета роботи та завдання дослідження. Експериментально-теоретичне обґрунтування раціонального і безпечного використання класичних і ад'ювантних болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку за умов модельованого алергічного енцефаломієліту на фоні базової гормонотерапії.

Згідно з метою дослідження були сформовані наступні задачі:

1. Визначити особливості знеболюючої активності неопіодних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.
2. Провести аналіз нейротропної активності протисудомних засобів за умов модельованої патології ЦНС.
3. Оцінити антиноцицептивний потенціал антидепресантів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.
4. Провести порівняльний фармакологічний аналіз засобів з нейропротективною активністю за умов експериментальної модельованої демієлінізуючої патології.
5. Провести аналіз фізико-хімічної сумісності комбінацій-лідерів за умов комбінованого введення.
6. Провести аналіз ультраструктурних та морфометричних змін в корі великих півкуль та гіпокампі за умов експериментального алергічного енцефаломієліту та використанням комбінацій-лідерів знеболюючої та нейропротективної терапії.
7. Обґрунтувати принципи раціонального та безпечного використання класичних і ад'ювантних болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку в умовах експериментального алергічного енцефаломієліту з урахуванням базової гормонотерапії патології в експерименті.

Об'єкт дослідження: больовий і невропатичний синдром та когнітивна дисфункція за умов експериментального алергічного енцефаломієліту.

Предмет дослідження: усунення болю шляхом застосування ряду неопіодних і ад'ювантних анальгетиків та корекція когнітивних і нейродегенеративних порушень засобами з нейропротективною активністю при ЕАЕ.

Методи дослідження: поведінкові, біохімічні, фармакологічні, нейрохімічні, гістоморфологічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. В експерименті вперше проведені системні порівняльні дослідження антиноцицептивного потенціалу класичних ненаркотичних (парацетамол, диклофенак натрію, ібупрофен, лорноксикам, мелоксикам, целекоксиб, кеторолак) і ад'ювантних (карбамазепін, топірамат, вальпроат натрію, габапентин, прегабалін, амітриптилін, флуоксетин, пароксетин, тразодон) анальгетиків, а також нейропротекторної активності цитиколіну, альфа-ліпоевої кислоти, ніцерголіну, донепезилу і фіксованої комбінації «В»-вітамінного комплексу нейровітану за умов модельованої демієлінізуючої патології – експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ). Доведене ключове значення активності РGH-синтази головного та спинного мозку в механізмах знеболюючої дії досліджуваних нестероїдних протизапальних засобів та вперше

проведений кореляційний аналіз між рівнем зазначеного фермента і антиноцицептивним потенціалом НПЗЗ. Теоретично обґрунтовані механізми нейропротекторної та ноотропної активності цитиколіну, альфа-ліпоевої кислоти, ніцерголіну, донепезилу і нейровітану та доцільність їх призначення для терапії та профілактики порушень когнітивних функцій, індукованих ЕАЕ. Вперше проведений системний поглиблений аналіз мітопротекторної активності в механізмах нейропротекції комбінації «метилпреднізолон + цитиколін» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту та доведена доцільність їх сумісного застосування як на фізико-хімічному рівні, так і на рівні фармакокінетичних взаємодій.

Встановлено, що застосування лікарських засобів з нейропротективною активністю здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість тварин з важким перебігом ЕАЕ. Показано, що найбільш оптимальним засобом нейропротекції при ЕАЕ за умов терапії метилпреднізолоном є цитиколін, який найбільш ефективно попереджає розвиток неврологічних порушень і статистично достовірно, в 3,3 - 4 рази ($p < 0,05$) порівняно з групою контролю зменшує тяжкість і тривалість перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту у тварин. Зазначено, що курсова нейропротективна терапія не забезпечує повного відновлення ультраструктурних змін мозку, проте збільшує щільність упаковки синаптичних везикул і сприяє стабілізації структури пресинаптичної та постсинаптичної мембран, активує компенсаторно-адаптаційні процеси в нейрональних і гліальних клітинах, а також стабілізує стан гематомікроциркуляторного русла.

Доведено, що в комбінаціях «метилпреднізолон-мелоксикам», «метилпреднізолон-габапентин» і «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі), так і на рівні фармакокінетичних взаємодій. З урахуванням відмінностей в періодах напіввиведення, а також непрямому механізмі розвитку терапевтичного ефекту досліджених сполук з фармакокінетичної точки зору найбільш доцільною є комбінація метилпреднізолону з цитиколіном.

Експериментально обґрунтовано, що застосування комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам» і «метилпреднізолон-габапентин» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту є ефективним та раціональним напрямком фармакотерапії больового синдрому, а призначення композиції «метилпреднізолон-цитиколін», що сприяє гальмуванню біодеградації сфінгомієліну і кардіоліпіну, відновлює активність глутатіонредуктази, стимулюючи синтез глутатіона і виявляючи антиапоптичний ефект, представляється перспективним напрямком нейропротективної терапії ЕАЕ.

Наукова новизна підтверджена Патентом України на корисну модель №111354 та інформаційними листами (вип. 2 та вип. 8, 2015 р.).

Практичне значення і впровадження результатів наукової роботи. Практичне значення дисертаційної роботи полягає в поглибленні уявлень про фармакодинамічні та фармакокінетичні особливості класичних і ад'ювантних

болетамуючих засобів та засобів медикаментозного захисту мозку за умов експериментального алергічного енцефаломієліту на фоні базової гормонотерапії.

На підставі фармакологічних досліджень доведена висока ноотропна та нейропротективна активність фармацевтичної комбінації цитиколіну та метилпреднізолону. Експериментально обґрунтована доцільність комбінованої терапії больових синдромів з використанням неопіїдних анальгетиків, антидепресантів та антиконвульсантів із базовою фармакотерапією розсіяного склерозу з метою підвищення ефективності антиноцицептивної терапії у хворих на розсіяний склероз.

За результатами дисертаційної роботи оформлено інформаційні листи з проблеми «Фармакологія» (вип. 2, 2015 р.; вип.. 8, 2015р.), Патент України на корисну модель №111354.

Результати проведених досліджень впроваджено в науково-педагогічну діяльність кафедр фармакології і клінічної фармакології ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет», Запорізького державного медичного університету, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет», Одеського національного медичного університету, Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, ЗО «Гродненський державний медичний університет» республіки Беларусь.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійно завершеною науковою працею. За участю наукового консультанта обраний напрямок дослідження, сформульовані мета та задачі, а також об'єм методичних підходів. Автором самостійно проведений інформаційно-патентний пошук, проведений аналіз літературних даних, відпрацьовані моделі та методи досліджень, проведені експериментальні дослідження, статистична обробка отриманих даних, систематизація отриманих результатів та їх наукова інтерпретація, сформульовані висновки та практичні рекомендації. Оформлення дисертаційної роботи та автореферату виконані дисертантом самостійно. Робота виконана на кафедрі фармакології і клінічної фармакології ДЗ «ДМА МОЗ України» (завідувач – к.мед.н., доцент С.М. Дронов). Дослідження енергозабезпечуючої функції мітохондрій та морфометричний аналіз нейронів виконані за консультативної допомоги зав. ЦНДЛ Запорізького державного медичного університету, д.мед.н., проф. А.В. Абрамова. Біохімічні та фармакологічні дослідження проведені за консультативної допомоги доцента кафедри загальної та біологічної хімії, к.мед.н. А.В. Мельника Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова. Комп'ютерне моделювання фармакокінетичної сумісності досліджуваних препаратів проведені за консультативної допомоги завідувача відділу фізико-хімічної фармакології Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України, академіка НАМН України, проф. М.Я. Головенко та с.н.с. д.б.н. В.Б. Ларіонова. Виявлення ультраструктурних змін утворень головного мозку проведено в лабораторії електронної мікроскопії ДЗ «ДМА МОЗ України» під керівництвом д.мед.н., проф. І.В. Твердохліба.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи представлені на: Науково-практичній конференції «Наукові розробки, передові технології, інновації» (Будапешт-Прага-Київ, 2014), XV конгресі СФУЛТ (Чернівці-Київ-Чикаго, 2014), Всеросійській конференції з міжнародною участю, присвяченій 90-річчю з дня народження академіка АМН СРСР Артура Вікторовича Вальдмана «Інновації в фармакології: від теорії до практики» (Санкт-Петербург, 2014), III Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини» (Суми, 2015), II Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Пріоритети та перспективи молодіжної науки» (Чернівці, 2015), III Міжнародній науково-практичній конференції «Економічний розвиток: теорія, методологія, управління» (Будапешт-Прага-Київ, 2015), Підсумковій LVIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (присвяченій пам'яті ректора, члена-кореспондента НАМН України, професора Леоніда Якимовича Ковальчука) (Тернопіль, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченій Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2015» (Запоріжжя, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених НМАПО імені П. Л. Шупика, присвяченій «Дню науки» «Інновації молодих вчених медиків і їх впровадження в практичну охорону здоров'я» (Київ, 2015), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії» (Вінниця, 2015), III Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (Київ, 2015), Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини» (Одеса, 2015), XXXIII Всеукраїнській науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (Харків, 2016), Науково-практичній конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (Запоріжжя, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 57 робіт, у тому числі 30 статей у фахових наукових виданнях, 1 монографія, 1 патент на корисну модель, 2 інформаційних листи, 1 авторське свідоцтво, 22 тези доповідей у матеріалах конгресів, з'їздів, науково-практичних конференцій та симпозіумів.

Обсяг та структура дисертаційної роботи. Дисертація складається з анотації, списку друкованих праць, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел, що включає 334 посилання (з них 209 із кириличної графікою, 125 - із латинською) та додатків. Робота викладена на 373 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 45 таблицями та 52 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Експериментальні дослідження виконані на 518 білих статевозрілих нелінійних щурах масою 210-300 г.

Утримання експериментальних тварин здійснювалося відповідно до санітарно-гігієнічних норм віварію ДЗ «ДМА МОЗ України» (температура повітря: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, світлий/темний цикл: 12/12 годин, їжа та пиття *ad libitum*). Усі досліди проводили у відповідності до законодавства України [Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Відомості Верховної Ради України. – 2006. - № 27. – С. 230], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe, Strasbourg, 1986. – 53 p.]. Протоколи експериментальних досліджень та їх результати затверджені рішенням комісії з біоетики ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (протокол №2 від 06.02.2017 р.).

Відтворення модельованого еквіваленту розсіяного склерозу – експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) – у тварин проводили шляхом одноразового введення в сполучну тканину хвоста лабораторних щурів енцефалітогенної емульсії (повний ад'ювант Фрейнда (ПАФ) + гомогенат мозку у співвідношенні 1:1) з розрахунку 0,1 мл на 100 г маси тварини [Абдурасулова И.Н. и соавт., 2004; Degano A.L. et al., 2000; Заргарова Т.А. и соавт., 1999]. Щодня протягом місяця (середня тривалість ЕАЕ) тварин зважували і оцінювали їх неврологічний статус: реєстрували час початку захворювання, його тривалість і тяжкість неврологічних розладів, яку оцінювали в балах за клінічним індексом [Нефедов А.А., 2014; Серебряная Н.Б. и соавт., 2010].

Дози досліджуваних препаратів запозичені з літературних джерел і знаходилися в діапазоні терапевтичних (ED_{50}), які рекомендовані для досліджень знеболюючих, нейропротекторних чи органопротекторних властивостей в експерименті. Контрольна група тварин одержувала дистильовану воду. В роботі використані неопіодні анальгетики та ад'ювантні знеболюючі засоби (антиконвульсанти та антидепресанти): пара-ацетамінофенол (парацетамол), 150 мг/кг [Горецкая М.В. и соавт., 2004; Дроговоз С.М. и соавт., 1994]; диклофенак натрію, 10 мг/кг [Ferreira-Gomes J. et al., 2012; Aouacheri W. et al., 2009]; ібупрофен, 5 мг/кг [Орлова Т.В. и соавт., 2012; Mourouzis C. et al., 2003]; лорноксикам (ксефокам), 10 мг/кг [Futaki N. et al., 1997]; мелоксикам, 10 мг/кг [Мустафин Р.А. и соавт., 2010]; целекоксиб (ранселекс), 50 мг/кг [Коскава Е.А. et al., 2010]; кеторолак (кеторол), 5 мг/кг [Santos C.L. et al., 2007]; карбамазепін, 150 мг/кг [Шастун Н.П. и соавт., 2015; Inoue M. et al., 2014]; топірамат (топіромакс), 300 мг/кг [Шастун Н.П. и соавт., 2015; Inoue M. et al., 2014]; вальпроат натрію (вальпроком хроно), 155 мг/кг [Шастун Н.П. и соавт., 2015; Inoue M. et al., 2014]; габапентин (габалефт), 100 мг/кг [Шастун Н.П. и соавт., 2015; Inoue M. et al., 2014]; прегабалін (лірика), 100 мг/кг [R.R. Wang et al., 2016]; амітриптилін, 150 мг/кг [Mahmood D. et al., 2010; Андреева Н.И., 2000]; флуоксетин, 300 мг/кг [Шишкина Г.Т. и соавт., 2006; Андреева Н.И., 2000]; пароксетин, 100 мг/кг

[Пивина С.Г. и соавт., 2011; Андреева Н.И., 2000]; тразодон (третіко), 155 мг/кг [Marcoli M. et al., 2010]. Засоби нейропротективно-антиоксидантного комплексу: нейровітан, 25 мг/кг (еквівалентно октотіаміну) [Мамчур В.И. и соавт., 2011]; цитиколін (цераксон), 500 мг/кг [Lee H.J. et al., 2009; Teather L.A. et al., 2005]; альфа-ліпоева кислота (берлітін), 50 мг/кг [Гайнетдинова А.Н. и соавт., 2015; Zvereva E. et al., 2006]; ніцерголін, 10 мг/кг [Ogawa N. et al., 1993]; донепезил (альмер), 10 мг/кг [Kasa P. et al., 2000].

Усі використані у процесі проведення експериментальних досліджень лікарські засоби вводили інтрагастрально один раз на добу одноразово (неопіодні анальгетики, антиконвульсанти та антидепресанти) або протягом 14 діб (засоби нейропротективно-антиоксидантного комплексу). Для отримання однорідної стабільної суспензії для внутрішньошлункового введення таблетованих форм, використаний Твін-80 (Полісорбат LAUROPAN T/80, Італія).

Дослідження інтегративних функцій мозку проводили в тестах умовної реакції пасивного уникнення (УРПУ) за умов природнього згасання набутої навички [Иноземцев А.Н. и соавт., 2007; Манухина Е.Б. и соавт., 2008; Радионова К.С. и соавт., 2008; Elrod K. et al., 1988] і «відкритого поля» [Калуев А.В., 1999]. В якості інтегральних критеріїв використані: латентний період (ЛП) пасивно-оборонного навику; $K_{ПБВ}$ – відношення числа щурів, які уподобали «безпечний» відсік до кількості тварин, які вибрали «небезпечний»; коефіцієнт антиамнестичної дії препаратів ($K_{Аа}$) [Радионова К.С. и соавт., 2008]:

$$K_{Аа} = (\Delta ЛП_{\text{препарат}} - \Delta ЛП_{\text{ЕАЕ}}) / (\Delta ЛП_{\text{інтактні}} - \Delta ЛП_{\text{ЕАЕ}}) \cdot 100\%,$$

де $\Delta ЛП = ЛП_{\text{тестування}} - ЛП_{\text{вироблення рефлексу}}$

Для оцінки антиноцицептивної активності використаний метод електричного подразнення кореня хвоста щура. Оцінку больової чутливості здійснювали через 2-3 хвилини, 30, 60, 90, 120 та 180 хвилин по появі голосової реакції (писк, вокалізація) у відповідь на поступово зростаюче електричне подразнення від електростимулятора ЕСЛ-1. Тривалість кожного подразника не перевищувала 1 с [Михайлов В.А. и соавт., 1990; Carroll M.N. et al., 1960].

Оцінку м'язового тону проводили в тесті підтягування на горизонтальній перекладині. Невиконання цього тесту свідчило про порушення м'язового тону і розвиток неврологічного дефіциту [Воронина Т.А. и соавт., 2005; Торопина Г.Г. и соавт., 2003].

Аналіз активності антидепресантів проводили в тест-моделі Порсолта (тест форсованого або примусового плавання). В якості оціночних критеріїв використані: латентність (сек) першого «зависання»; кількість «зависань» і сумарний час іммобільності (сек); клімбінг (кількість спроб вибратися з циліндру) [Хабриев Р.У., 2005; Porsolt R.D. et al., 1977].

Тактильну алодинію вивчали в модифікації філаментного тесту von Frey шляхом реєстрації тиску, при якому тварини відсмикували ліву задню лапу, уникаючи впливу наростаючих по силі стимулів [Chaplan S.R. et al., 1994]. Оцінку проявів хімічної гіпералгезії проводили з використанням формалінового тесту після підшкірної ін'єкції формаліну в дорсальну поверхню лапки шляхом підрахунку

числа здригувань тварини [Shibata M. et al., 1989]. Вивчення проявів термічної гіпералгезії проводили з використанням тесту «гаряча пластина», реєструючи час від моменту поміщення тварини на пластину до моменту першого облизування задніх лап [Hunnskaar S. et al., 1986].

Тканини головного та спинного мозку для досліджень отримували на 20 добу після інокуляції енцефалітогенної емульсії. Для біохімічних досліджень тканини головного мозку (кора великих півкуль та гіпокамп) гомогенізували на холоді (+4 – +6°C) за допомогою скляного гомогенізатора в сольовому ізотонічному середовищі - 0,15 М розчин KCl з розрахунку тканина/розчин KCl 1:40 [Прохорова М.И. и соавт., 1982]. Гомогенат головного та спинного мозку готували за допомогою буферного розчину 0,05М трис- HCl, pH 8,0, та центрифугували 20 хвилин при 13 об/хв. Надосадочну рідину зберігали при температурі від -18°C до -25°C. Солюбілізований препарат ензиму ЦОГ готували за допомогою ТВІН – 20 [Мевх А.Т. и соавт., 1982].

РГН – синтазну активність ферменту визначали спектрофотометричним методом (СФ-56 ЛОМО – спектр). Питому активність виражали в мікромолях арахідонової кислоти, окислених 1 мг білка протягом 1 хвилини [Кузнецова Ю.А. и соавт., 1998; Мевх А.Т. и соавт., 1982].

Стан окисдантно-антиоксидантного балансу оцінювали за рівнем малонового діальдегіду (МДА) [Стальная И.Д. и соавт., 1977; Гончаренко М.С. и соавт., 1985], а також активністю супероксиддисмутази (СОД) [Чевари С. и соавт., 1988].

Для оцінки показників енергообміну у тканині головного мозку визначали вміст аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) методом тонкошарової хроматографії в безбілковому екстракті тканини головного мозку 1:10 (10% розчин трихлороцтової кислоти) на пластинках фірми «Merk» (Німеччина) [Захаров Н.Б. и соавт., 1969; Кузьменко Д.И. и соавт., 2008; Высоцкий И.Ю., 2008]. Направленість та інтенсивність гліколізу оцінювали спектрофотометрично за рівнем пірувату (метод Цоха-Ломпрехта) та лактату (метод Хохорста); активність окиснення в циклі трикарбонових кислот – за вмістом малату (метод Хохорста), ізоцитрату (метод Зібберта) та аспартату [Прохорова М.И. и соавт., 1982; Чекман И.С. и соавт., 2010].

Функціональний стан мітохондрій оцінювався фотометрично по відкриванню мітохондріальної пори (МП) та мітохондріальному трансмембранному потенціалу (Ψ) [Аверченко Е.А. и соавт., 2009; Аكوпова О.В. и соавт. 2004; Беленичев И.Ф. и соавт, 2009].

Для морфологічних досліджень нейронів на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи товщиною 5 мікрон. Для визначення вмісту нуклеїнових кислот зрізи депарафінували та фарбували галоціанінхромовими галунами за Ейнарсоном [Пирс Э., 1962; Селиванов Е.В., 2003]. Морфометричні дослідження здійснювали в напівавтоматичному режимі за допомогою 8-бітної CCD-камери СОНУ-4922 (СОНУ Inc., США) та комп'ютерної системи аналізу зображень VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина) на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Germany) при збільшенні x40. Для ультраструктурного дослідження з отриманих зразків гіпокампа та кори головного мозку на ультрамікротомі УМТП-6 М ("SELM", Україна) виготовляли ультратонкі зрізи товщиною 60-80 нм з подальшим їх розміщенням на опорних

сітках (Mesh Regular Grid 200). Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-100-01 ("SELMI", Україна) при напрузі прискорення 70-75кВ і первинних збільшеннях від 4000 до 20000 за стандартною схемою [Reynolds E. S., 1963; Саркисов Д.С., 1996; Уикли Б., 1975].

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний номер AGAR 909 E415822FA), Описова статистика включала розрахунки середніх арифметичних значень (M) та стандартних похибок середнього ($\pm m$).

Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилась перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Шапіро-Уїлка).

За умов нормального розподілу встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t -критерію Стюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного U - критерію Мана-Уїтні.

Для множинного порівняльного аналізу, за умов нормального розподілу, дослідні групи порівнювалися за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA та критерію Дункана. Для аналізу закономірностей зв'язку між окремими показниками проведений кореляційний аналіз за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона.

Використовували 3 рівня статистичної значимості відмінностей результатів досліджень – $p < 0,05$; $p < 0,01$ та $p < 0,001$. Критичне значення рівня статистичної значимості (p) приймалося $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$).

Всі використані при виконанні даної роботи одиниці вимірювання та параметри наведені у відповідності до міжнародної системи одиниць [Лакин Г.Ф., 1990; Лапач С.Н., 2001; Минцер О.П., 1982; Халафян А.А., 2007; Гланц С., 1998].

Результати досліджень та їх обговорення. *Оцінка відповідності моделі експериментального алергічного енцефаломієліту клінічному перебігу розсіяного склерозу.* Аналіз результатів проведених нами досліджень вказує на те, що за умов одноразової підшкірної інокуляції енцефалітогенної суміші в повному ад'ютанті Фрейнда у тварин групи активного контролю реєструвався розвиток неврологічних порушень різного ступеня тяжкості: пік клінічних проявів алергічного енцефаломієліту у більшості щурів розвивався на 12 - 14 добу і тривав в середньому 4 дні; при цьому тривалість ЕАЕ склала $16,4 \pm 1,8$ днів при середньому кумулятивному індексі 27,2 балів. Встановлено, що перебіг ЕАЕ змінював поведінкові реакції щурів та викликав розвиток когнітивної дисфункції, що проявлялося суттєвим пригніченням рухової та орієнтовно-дослідницької активності експериментальних тварин і ослабленням процесів навчання та консолідації енграм пам'яті. При цьому погіршення мнестичних процесів, як свідчення когнітивного дефіциту на тлі перебігу експериментального аутоімунного енцефаломієліту у щурів, супроводжувалося проявами гіперактивації процесів вільнорадикального окислення ліпідів і білків та суттєвим пригніченням системи антиоксидантного захисту як у неокортексі, так і у гіпокампі. Водночас супероксид і пероксинітрит, які

утворюються за умов оксидативного стресу, ініціювали розвиток стійкої мітохондріальної дисфункції з подальшим енергодефіцитом нейронів. Так, ЕАЕ викликав збільшення швидкості відкривання мітохондріальної пори в 9,1 рази ($p < 0,05$) і падіння потенціалу внутрішньої мембрани мітохондрій на 78% ($p < 0,05$), призводив до зниження рівнів макроергічних фосфатів, порушень вуглеводного обміну і енергозабезпечення нейронів кори головного мозку, ознаками яких було гальмування компенсаторних мітохондріально-цитозольних шунтів вироблення енергії, зокрема, малат-аспартатного шунта, що виражалось в зменшенні рівня малату на 51% ($p < 0,05$) і аспартату на 40% ($p < 0,05$) порівняно з групою інтактних тварин. При цьому реєструвалася активація анаеробного гліколізу (підвищення співвідношення лактат/піруват) та розвиток енергетичного дефіциту (зменшення вмісту АТФ на 42% ($p < 0,05$), АДФ – на 43% ($p < 0,05$) на тлі зростання пулу АМФ на 82% ($p < 0,05$)).

Дослідженнями морфометричних показників стану сенсомоторної зони кори головного мозку встановлено, що перебіг ЕАЕ призводив до зменшення щільності нейронів, розвитку явищ набряку їх тіл, пригнічення біосинтетичних реакцій та активації процесів апоптозу. Так, експериментально визначено, що за умов експериментального алергічного енцефаломієліту спостерігалось зменшення щільності нейроцитів на 19% ($p < 0,05$), що свідчило про загибель клітин, і підвищення їх площі на 10%, що підтверджувало розвиток їх набряку. Крім того, було зареєстроване зниження транскрипційних процесів в нейронах сенсомоторної кори, про що свідчило зниження рівня РНК на 21% ($p < 0,05$). До того ж, у неокортексі тварин з експериментальною патологією спостерігалось підвищення щільності апоптичних та деструктивних клітин на 150% ($p < 0,05$). При цьому частка апоптичних клітин в зазначеній структурі головного мозку зростає практично в 5 разів ($p < 0,05$)).

Аналізом результатів дослідження ультраструктурних характеристик гіпокампу показано, що в групі щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом апоптоз в нейронах відбувався переважно за мітохондріальним типом, причому більшість нейронів знаходилась на початкових стадіях апоптотичних процесів. Нами зареєстроване крупнодисперсне пошкодження нуклеоплазми нейронів з частково збереженою активністю ядра (рис. 1).

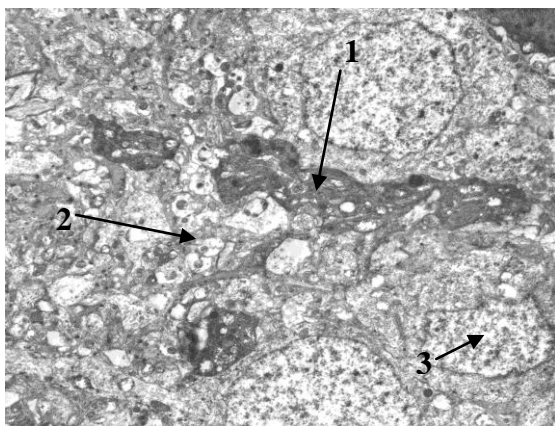


Рис. 1. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи активного контролю (ЕАЕ). Зб. $\times 5000$.

Крупнодисперсне пошкодження нуклеоплазми нейронів, набухання і утворення вакуолеподібних цистерн, руйнування крист і часткова дефрагментація зовнішніх мембран мітохондрій.

Позначення:

1. нейрон;
2. протоплазматичний астроцит;
3. безмієлінове нерве волокно.

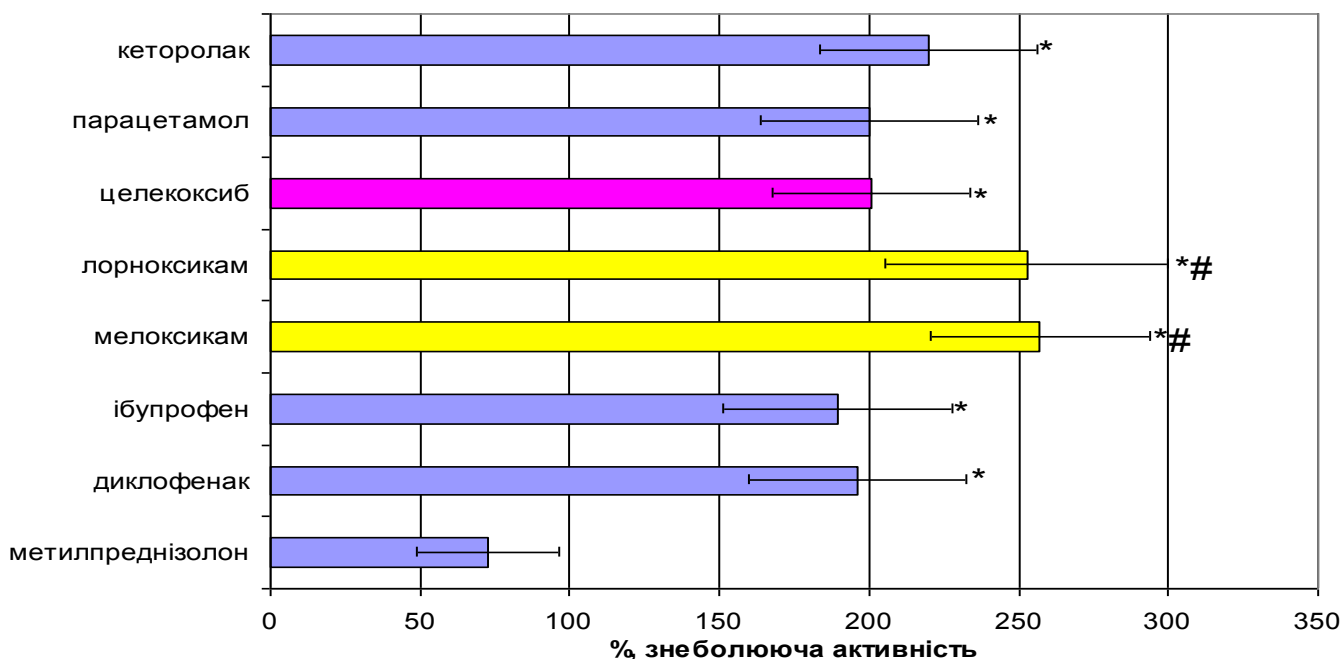
В нейронах гіпокампу даної експериментальної групи порушення гранулярного ретикулуму у перикарионі проявлялися набуханням і утворенням вакуолеподібних цистерн. Індукція ЕАЕ викликала руйнування крист, часткову дефрагментацію зовнішніх мембран частини мітохондріального апарату клітин.

В цілому, у ході експерименту показана ефективність моделювання експериментального алергічного енцефаломієліту у білих нелінійних щурів, а також відповідність моделі хронічному проградієнтному перебігу розсіяного склерозу у людини за сукупністю клінічних проявів, гістологічних, імунних і біохімічних змін [Абдурасулова И.Н. и соавт., 2009; Волошина Н.П. и соавт., 2005].

Порівняльний аналіз антиноцицептивної активності нестероїдних протизапальних засобів та ад'ювантних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту. Як свідчать результати, отримані нами, за умов одноразової підшкірної інюкуляції енцефалітогенної суміші в повному ад'юванті Фрейнда у тварин контрольної групи розвивалося зниження порогу ноцицептивної відповіді на електричне подразнення хвоста на 41,5% ($p < 0,05$) в порівнянні з інтактними гризунами. Цілком імовірно, що гіпералгезія на ранніх етапах розвитку ЕАЕ пояснювалася зростанням активності РGH-синтази у 2,8 рази ($p < 0,05$) та у 2,6 рази ($p < 0,05$) у головному та спинному мозку відповідно, що викликало збільшення рівня прозапальних похідних арахідонової кислоти, які сприяли зниженню порогу ноцицепції.

Порівняльним аналізом показників болезаспокійливої активності комбінацій метилпреднізолону (М) з анальгетиками за умов сформованого ЕАЕ показано, що їх антиноцицептивний потенціал (з урахуванням базової терапії метилпреднізолоном) зменшувався в ряду мелоксикам \geq лорноксикам $>$ кеторолак $>$ целекоксиб $>$ парацетамол \geq диклофенак натрію $>$ ібупрофен. Відповідно, максимальний вплив на поріг ноцицепції за даних умов експерименту чинили мелоксикам та лорноксикам. Зокрема, при застосуванні мелоксикаму під анальгетичної активності препарату, зафіксований на 90 хвилині після введення, проявлявся підвищенням порогу болі майже в 4 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з групою активного контролю (експериментальний алергічний енцефаломієліт). Знеболюючий вплив лорноксикаму дещо поступався болетамуючій дії мелоксикаму: збільшення больового порогу, обумовлене препаратом, на 252,6% ($p < 0,05$) перевищувало відповідний показник тварин контрольної групи (рис. 2).

Водночас встановлено, що антиноцицептивний потенціал використаних засобів безпосередньо корелював із змінами активності РGH-синтази головного і спинного мозку експериментальних тварин з модельованою патологією, що свідчить про взаємозв'язок між ступенем інактивації зазначеного ферменту та терапевтичною активністю цих засобів. Так, комбіноване введення метилпреднізолону з диклофенаком натрію, целекоксибом та мелоксикамом сприяло зниженню активності РGH-синтази в структурах головного мозку на 49,8% ($p < 0,05$), 50,4% ($p < 0,05$) та 51% ($p < 0,05$) відповідно у порівнянні з показниками групи контролю.



Примітки:

* - $p < 0,05$ по відношенню до показників больового порогу тварин групи активного контролю (ЕАЕ);

- міжгрупові порівняння із використанням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, критерій Дункана.

Рис. 2. Зміни антиноцицептивного потенціалу неопіїдних анальгетиків за умов ЕАЕ (90 хвилина) на тлі базової гормонотерапії метилпреднізолоном (n=10)

Ці ж засоби виражено знижували активність PGH-синтази і в спинному мозку на 23,9% ($p < 0,05$) (М + диклофенак), на 34% ($p < 0,05$) (М + целекоксиб) та на 47,4% ($p < 0,05$) (М + мелоксикам) у порівнянні з показниками групи контролю (табл. 1). Ми вважаємо, що терапевтична ефективність досліджених неопіїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту, в першу чергу, опосередковується їх впливом на активність PGH-синтази та, відповідно, рівень продукції PGD_2 , який піддається дегідратації з утворенням біологічно активних простагландинів серії J_2 , зокрема, 15-дезоксипростагландину J_2 (15d-PGJ₂). Цей простагландин є природним хімічно стійким протизапальним похідним PGD_2 з вираженою антифлогістичною дією, який може сприяти корекції нейродегенеративних порушень при хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона, а також розсіяному склерозі [Palumbo S. et al., 2012].

Проведеним нами аналізом анальгетичної активності антидепресантів та антиконвульсантів як засобів корекції ноцицептивного болю за умов ЕАЕ встановлено, що їх антиноцицептивний потенціал поступався виразності знеболюючої дії НПЗЗ. Так, за даних умов експерименту максимальна анальгетична активність реєструвалася у флуоксетину і тразодону або ж прегабаліну і габапентину, що відповідало збільшенню порогу болі при їх введенні в середньому в 2,5 рази ($p \leq 0,05$).

Таблиця 1

Вплив неопіюїдних анальгетиків на рівень активності PGH-синтази в гомогенаті головного та спинного мозку у тварин за умов ЕАЕ, $M \pm m$, $n=10$

Дослідні групи	PGH – синтаза, мкмоль/хв/мг білка	
	Головний мозок	Спинний мозок
Пасивний контроль (інтактні)	17,5±2,38	14,6±1,02
Активний контроль (ЕАЕ)	49,2±6,86 [□]	37,3±3,14 [□]
ЕАЕ + Метилпреднізолон	32,9±4,31	28,4±2,56
ЕАЕ + М + диклофенак	24,7±2,65*	28,4±4,04
ЕАЕ + М + целекоксиб	24,4±2,26*	24,6±1,58*
ЕАЕ + М + мелоксикам	24,1±4,24*	23,8±2,13*

Примітки: □ - $p < 0,05$ по відношенню до показників інтактного контролю;

* - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю (ЕАЕ)

До того ж, застосування як антиконвульсантів, так і антидепресантів не було спроможним повністю нормалізувати поведінкові реакції та відновити м'язовий тонус експериментальних щурів, порушених індукцією ЕАЕ.

Отже, в ряду досліджених неопіюїдних анальгетиків, антидепресантів та антиконвульсантів максимальну терапевтичну ефективність як засіб корекції ноцицептивного болю за умов ЕАЕ на фоні базової терапії метилпреднізолоном виявляв мелоксикам, що дає підстави рекомендувати саме його в якості анальгетика вибору для усунення соматичних больових синдромів при розсіяному склерозі.

Водночас, як свідчать результати проведених нами досліджень, антиконвульсанти та антидепресанти виявили високу терапевтичну ефективність в терапії невропатичних больових синдромів, викликаних індукцією ЕАЕ.

Нами показано, що підшкірна інюкуляція енцефалітогенної суміші у тварин експериментальних груп викликала статистично значиме зниження порогу тактильної чутливості в 2,3 рази ($p < 0,001$) по відношенню до інтактного контролю. При цьому ін'єкція 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи щурів призводило до статистично значимого збільшення загальної кількості здригувань в 9,5 рази ($p < 0,001$). До того ж, у тесті «гаряча пластина» у щурів з ЕАЕ-індукованою невропатією латентний період реакції уникнення статистично значимо знижувався в 1,7 рази ($p < 0,05$) по відношенню до групи інтактного контролю, що свідчило про розвиток нейрональної сенситизації, алодинії і гіпералгезії.

Як свідчать результати, отримані нами, після курсового введення протисудомних засобів або ж антидепресантів при проведенні механічної стимуляції задньої кінцівки реєструвалося підвищення порогу тактильної чутливості. Здатність зменшувати вираженість тактильної алодинії зменшувалась у ряду габапентин (-79%, $p < 0,05$) \geq прегабалін (-70%, $p < 0,05$) $>$ натрію вальпроат (-42%, $p > 0,05$) \geq топірамат (-37%, $p > 0,05$) $>$ карбамазепін (-23%, $p > 0,05$). При цьому статистично

значиме підвищення порогу алодинії по відношенню до показників активного контролю під впливом антидепресантів реєструвалося тільки у тварин, яким вводили амітриптилін і тразодон (60%, $p < 0,05$ і 40%, $p < 0,05$ відповідно) (табл. 2).

Показано, що після курсового введення антиконвульсантів та антидепресантів загальна кількість здригувань, що викликаються ін'єкцією 0,5% розчину формаліну в тильну поверхню стопи ЕАЕ-асоційованих щурів, було меншим, ніж у групі контролю. Так, кількість відповідей ранньої і пізньої фази під впливом габапентину і прегабаліну, а також амітриптиліну статистично значимо зменшувалася в середньому на 43% ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин контрольної групи. Крім того, продемонстровано, що за умов курсового введення всіх досліджених антиконвульсантів реєструвалося статистично значиме збільшення латентного періоду реакції облизування лапок в середньому на 52% ($p < 0,05$).

Таблиця 2

**Зміни тактильної чутливості у щурів з індукованим ЕАЕ
після курсового введення антиконвульсантів та антидепресантів, $M \pm m$,
 $n=12$**

<i>Умови експерименту</i>	<i>Тактильна алодинія, поріг відсмикування, г</i>
Пасивний контроль (інтактні)	$12,9 \pm 1,39$
Активний контроль (ЕАЕ)	$5,7 \pm 0,66$
Натрію вальпроат, 155 мг/кг	$8,1 \pm 1,53$
Габапентин, 100 мг/кг	$10,2 \pm 1,63^*$
Прегабалін, 100 мг/кг	$9,7 \pm 1,80^*$
Амітриптилін, 100 мг/кг	$9,1 \pm 1,63^*$
Тразодон, 100 мг/кг	$8,6 \pm 1,80^*$

*Примітка. * - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю.*

Максимальна виразність терапевтичного ефекту габапентину і прегабаліну пояснюється, очевидно, їх здатністю зв'язуватися з субодиницею $\alpha 2\delta$ (альфа-2-дельта) вольтажзалежних кальцієвих N-каналів, розташованих в поверхневій пластинці заднього рогу спинного мозку, які беруть участь у формуванні невропатичного болю [Dworkin R.H. et al., 2007]. До того ж, антиноцицептивні ефекти зазначених препаратів можуть обумовлюватися гальмуванням вивільнення збуджуючих амінокислот з пресинаптичних закінчень [Coderre T. J. et al., 2005], оскільки при більшості клінічних форм невропатичного болю канали NMDA-рецепторів повністю відкриті. Це сприяє кальцієвому інфлюксу, підвищенню нейрональної збудливості та генної експресії, внаслідок чого розвивається нейрональна сенситизація, алодинія і гіпералгезія [Banerjee M. et al., 2013].

Вважається, що антиноцицептивні властивості антидепресантів більш виражені у препаратів, що впливають на як серотонінергічну, так і норадренергічну нейромедіаторні системи [Тарасова С.В. и соавт., 2008], що підтверджують і результати нашого дослідження. Найбільшу доказову базу при терапії

невропатичних больових синдромів має амітриптилін [Crucci G. et al., 2007; McQuay H.J. et al., 1996].

Отже, в ряду досліджених антидепресантів та антиконвульсантів максимальну терапевтичну ефективність як засоби корекції невропатичного болю за умов ЕАЕ на фоні базової терапії метилпреднізолоном виявляли габапентин, прегабалін та амітриптилін, що дає підстави рекомендувати їх в якості ад'ювантних анальгетиків для усунення невропатичних больових синдромів при розсіяному склерозі. Водночас необхідно враховувати, що навіть сучасні антиконвульсанти не виявляють достатню специфічність для блокування передачі тільки ноцицептивного сигналу, и як наслідок, викликають ряд побічних ефектів, зокрема, можуть посилювати симптоми слабості і атаксії у хворих на розсіяний склероз.

Аналіз впливу ад'ювантних анальгетиків на активність процесів вільно-радикального окислення в утвореннях головного мозку щурів з ЕАЕ. Як свідчать отримані нами результати чинної серії досліджень, перебіг реакцій вільно-радикального окислення ліпідів та білків, які активізувалися при ЕАЕ та впливали на розвиток його ускладнень, найбільш виражено гальмувався за умов комбінованого застосування метилпреднізолону (як засобу базової гормональної терапії) та антиконвульсантів. Зокрема, вони статистично значимо зменшували рівень МДА в корі великих півкуль та стовбурі головного мозку.

При цьому максимальне зниження вмісту МДА відмічалось у неокортексі під впливом габапентину (Г, - 67%, $p < 0,05$) та прегабаліну (П, -68%, $p < 0,05$). В меншій мірі, однак статистично значимо, зменшення цього показника відмічалось також після введення топірамату, вальпроату натрію та карбамазепіну (від 1,91 до 2,53 рази) (табл. 3).

Водночас вплив комбінованого введення метилпреднізолону (М) та антиконвульсантів на стан системи антиоксидантного захисту характеризувалася відновленням активності СОД у неокортексі при використанні, в першу чергу, протисудомних «ГАМК-подібних» засобів – габапентину та прегабаліну. За ступенем впливу на цей показник препарати розмістилися наступним чином: прегабалін (П) (в 7 разів, $p < 0,05$) > габапентин (Г) (в 5,5 разів, $p < 0,05$) ≥ карбамазепін (К) (в 5 разів, $p < 0,05$) > вальпроат натрію (В) (в 3,5 рази, $p < 0,05$) ≥ топірамат (Т) (в 3 рази, $p < 0,05$). При цьому застосування лише метилпреднізолону як засобу базової гормональної терапії сприяло тільки помірному підвищенню активності СОД (+146%, $p > 0,05$) (табл. 3).

Відомо, що вільні радикали, які у великій кількості утворюються у вогнищах аутоімунного запалення активованими макрофагами і мікроглією, призводять до пошкодження клітинних мембран і ДНК олігодендроцитів та нейронів з розвитком демієлінізації і руйнуванням аксонів [Бойко А.Н. и соавт., 2003]. У фізіологічних умовах шкідливу дію вільних радикалів стримують ендogenous субстанції, зокрема, каталаза, глутатіонпероксидаза, супероксиддисмутаза, токоферол, відновлений глутатіон.

Активність системи антиоксидантного захисту та процесів ПОЛ в утвореннях головного та спинного мозку щурів з ЕАЕ за умов комбінованого введення метилпреднізолону та антиконкульсантів, $M \pm m$, $n=10$

<i>Групи</i>	<i>Структури мозку</i>	<i>СОД, акт. ум. од. / мг білка</i>	<i>МДА, нмоль/мг</i>
Інтактні	Кора	0,443±0,07	0,261±0,02
	Стовбур	0,435±0,05	0,406±0,04
	Спинний мозок	0,627±0,06	0,364±0,04
ЕАЕ	Кора	0,101±0,08 [□]	1,585±0,11 [□]
	Стовбур	0,282±0,08 [□]	1,181±0,16 [□]
	Спинний мозок	0,180±0,05 [□]	1,890±0,22 [□]
М	Кора	0,249±0,07*	1,352±0,15
	Стовбур	0,320±0,15	1,171±0,13
	Спинний мозок	0,322±0,15*	1,470±0,11
М+К	Кора	0,535±0,13*	0,824±0,05*
	Стовбур	0,816±0,18*	0,489±0,05*
	Спинний мозок	0,615±0,14*	0,641±0,14*
М+Т	Кора	0,296±0,09*	1,031±0,07
	Стовбур	0,396±0,10*	0,583±0,07*
	Спинний мозок	0,277±0,08	0,933±0,10*
М+В	Кора	0,360±0,02*	0,632±0,01*
	Стовбур	0,441±0,01*	0,518±0,02*
	Спинний мозок	0,289±0,01	0,764±0,02*
М+Г	Кора	0,551±0,11*	0,517±0,05*
	Стовбур	0,229±0,08	0,803±0,05*
	Спинний мозок	0,411±0,08*	0,820±0,13*
М+П	Кора	0,712±0,07*	0,503±0,08*
	Стовбур	0,654±0,09*	0,603±0,15*
	Спинний мозок	0,427±0,10*	0,341±0,03*

Примітки: □ - $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю (інтактні);

* - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю (ЕАЕ).

Підвищена чутливість нейронів головного мозку до окислювального стресу може бути наслідком низького вмісту ферментів антиоксидантного захисту, високого рівня поліненасичених жирних кислот, іонів двовалентного заліза, що вивільняються при пошкодженні клітин. У хворих на РС виявляють істотне зниження вмісту і активності чинників антиоксидантного захисту та явні ознаки окисного стресу [Евтушенко С.К. и соавт., 2007; Коваленко П.А. и соавт., 2001]. Це є передумовою для цілеспрямованого використання антиоксидантних препаратів в комплексному лікуванні розсіяного склерозу.

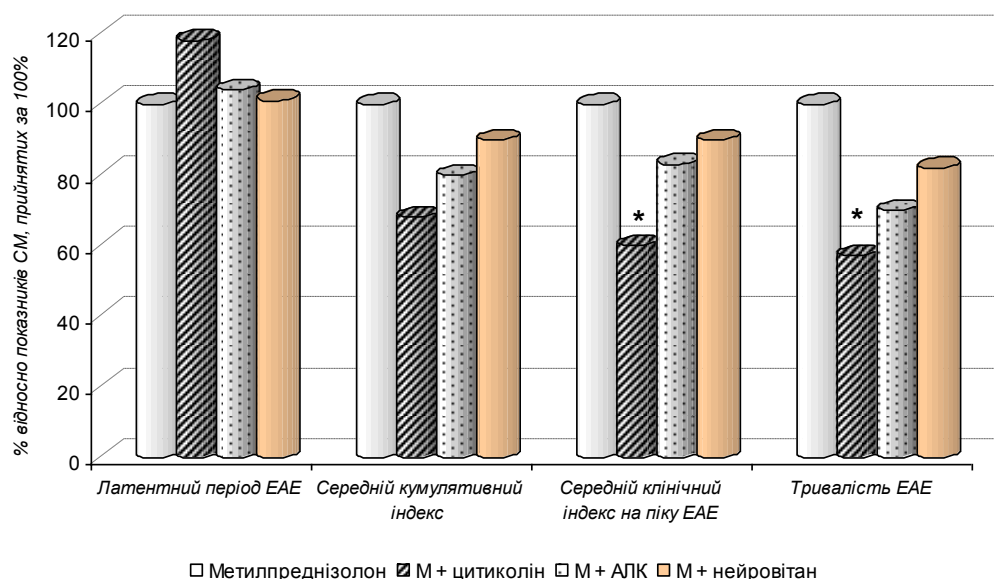
Аналіз впливу засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на перебіг ЕАЕ та когнітивні функції за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу. З урахуванням сучасних уявлень про патогенез розсіяного склерозу, натеper перспективним напрямом терапії захворювання все частіше розглядається нейропротекція, яка визначається як захист нейронів і глії від ушкодження, яке викликається екзо- або ендogenous шкідливими агентами чи процесами [Беленичев И.Ф. и соавт., 2009]. Нейропротекція при розсіяному склерозі повинна забезпечити профілактику нейроапоптозу, підтримку нервових та гліальних клітин, які гинуть, а також регенерацію ушкоджень та представляється як універсальний терапевтичний підхід в регуляції балансу імунних і нейротрофічних факторів за даної патології [Евтушенко С.К. и соавт., 2006; Одинак М.М. и соавт., 2005; Hohnfeld R. et al., 2004]. Враховуючи сучасні стандарти нейропротекції при розсіяному склерозі, а також фармако-економічні показники (співвідношення вартість/ефективність), натеper оптимальну нейропротективну терапію захворювання з позицій практичної неврології проводять із залученням засобів протизапальної терапії, препаратів протидії апоптозу нейронів та олігодендроцитів, засобів гальмування глутаматної ексайтотоксичності, антиоксидантної та ремієлінізуючої терапії [Одинак М.М. и соавт., 2005].

Результатами проведених нами досліджень встановлено, що максимально виражений нейропротекторний потенціал за умов експериментального алергічного енцефаломієліту виявляв цитиколін. Так, застосування зазначеного препарату з другого по 16 день після інокуляції ЕГС на тлі терапії метилпреднізолоном попереджало розвиток ЕАЕ у 37,5% тварин, а також зменшувало кількість гризунів з важким перебігом ЕАЕ до 12,5 % випадків спостережень. У порівнянні з моновведенням глюкокортикоїду, поєднане застосування цитиколіну і метилпреднізолону сильніше зменшувало виразність неврологічних порушень. Зокрема, в даній серії досліджень на 38% знижувався клінічний індекс на піку ЕАЕ, на 30% - кумулятивний індекс захворювання, а також вкорочувалася тривалість ЕАЕ з 8,4 до 5 днів у порівнянні з групою, що одержувала базову гормональну терапію. При цьому терапевтичний ефект α -ліпоєвої кислоти і нейровітану поступався виразності нейропротективної дії цитиколіну за даних умов експерименту: під впливом α -ліпоату клінічний індекс на піку патології зменшувався на 19%, кумулятивний - на 17%, а тривалість ЕАЕ - в 1,3 рази в порівнянні з групою, що одержувала метилпреднізолон (рис. 3).

Високий ноотропний потенціал цитиколіну у щурів з ЕАЕ підтверджувала виразна антиамнестична активність препарату, яка характеризувалася зростанням показника $K_{\text{Аа}}$. При цьому цитиколін сприяв збільшенню латентного періоду пасивно-оборонного навику, перевершуючи на 12 і 20 добу тестування на 49% ($p < 0,05$) і 63% ($p < 0,05$) відповідно даний показник групи активного контролю.

Нами зазначено, що препарат також зменшував дефіцит просторової пам'яті: під впливом цитиколіну значення $K_{\text{ПБВ}}$ у тварин з втраченою навичкою в умовах експериментальної демієлінізуючої патології ЦНС достовірно збільшувалося в 5 разів ($p < 0,05$). Водночас позитивний вплив на процеси введення інформації чинила

і α -ліпоева кислота, яка попереджала прискорене згасання набутої умовної навички в умовах експериментальної патології.

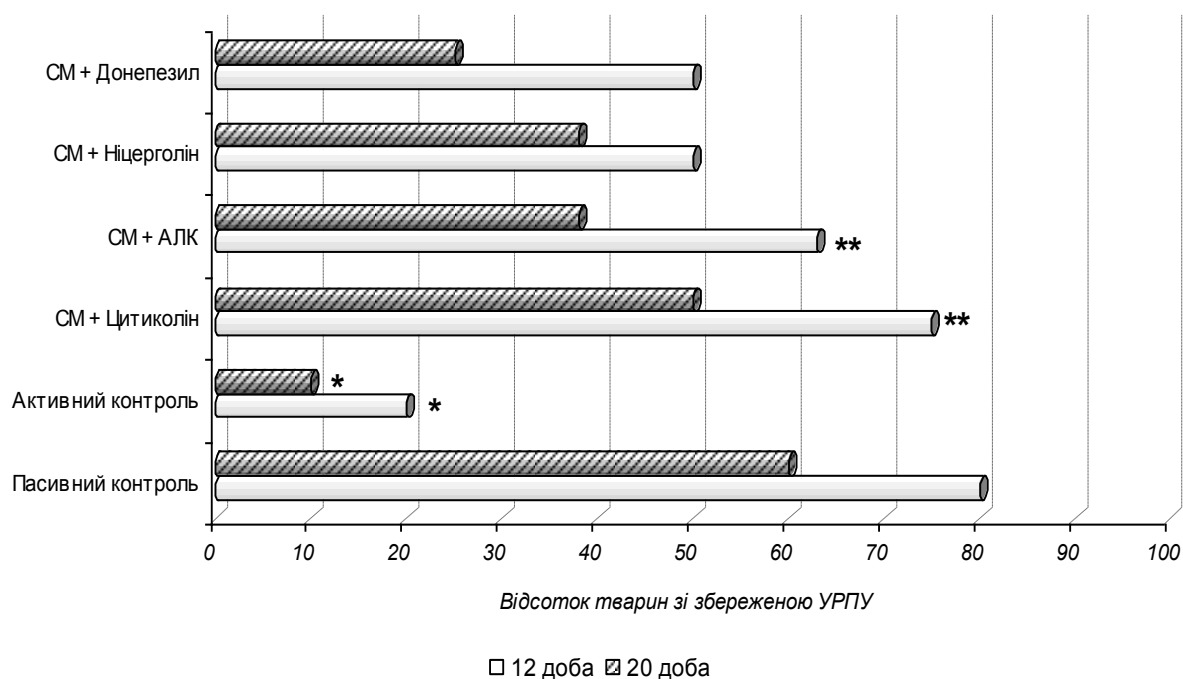


Примітка. * - $p < 0,05$ (відмінності достовірні в порівнянні з групою метилпреднізолону).

Рис. 3. Вплив курсового введення нейровітану, цитиколіну і α -ліпоевої кислоти на показники EAE за умов базової терапії метилпреднізолоном (n=10)

Найбільш виражений вплив альфа-ліпоева кислота виявляла при тривалому застосуванні, що проявлялося збільшенням коефіцієнта антиамнестичної активності (75% на 12 добу і 81% на 20 добу дослідження) та тенденцією до підвищення кількості тварин зі збереженим умовним рефлексом на 20 день спостережень. При цьому результати, отримані в групі тварин, які отримували ніцерголін (10 мг/кг), були співставлявані по динаміці і значеннях з групою, що одержувала α -ліпоеву кислоту (рис. 4).

Ймовірно, терапевтична дія α -ліпоевої кислоти при EAE реалізувалася за рахунок її антиоксидантних властивостей, що пов'язано з наявністю в структурі препарату тіолових груп. Крім того, α -ліпоат, можливо, гальмував експресію адгезивних молекул, синтез прозапальних цитокінів, збільшував внутрішньоклітинний пул глутатіону [Packer L. et al., 1997] та виявляв антирадикальну дію [Suzuki Y.J. et al., 1991]. Основним механізмом дії цитиколіну, що визначає його нейропротекторні властивості, ми вважаємо забезпечення збереження зовнішніх і внутрішніх (цитоплазматичних та мітохондріальних) нейрональних мембран, насамперед, шляхом ослаблення активності фосфоліпази A_2 , активації нейрональних мітохондріальних цитохромоксидаз та інгібування глутамат-індукованого апоптозу [Adibhatla R.M. et al., 2003; Mir C. et al., 2003]. Ноотропний і антиамнестичний вплив ніцерголіну може опосередковуватися його позитивним впливом на різні системи нейротрансмісії (ацетилхолінову, норадреналінову, дофамінову), передачу сигналів, транслокацію фосфоінозитид-протеїнкінази C і фактору росту нервових клітин [Мамчур В.И. и соавт., 2011].



Примітки: * - $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю (інтактні);
 ** - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю (ЕАЕ).

Рис. 4. Вплив засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на розподіл тварин зі збереженою навичкою УРПУ за умов ЕАЕ (n=10)

Отже, застосування лікарських засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість гризунів з важким перебігом ЕАЕ, а також уповільнювати розвиток когнітивного дефіциту у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу.

Вплив комбінації-лідера «метилпреднізолон + цитиколін» на процеси енергозабезпечення та функціональний стан мітохондрій нейронів кори головного мозку за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу. Відомо, що за умов оксидативного стресу, мітохондрії пошкоджуються одними з перших. Результатом цього є зниження процесів окислювального фосфорилування та синтезу АТФ. Крім цього, супероксид і пероксинітрит, які утворюються в «паразитарних» реакціях на початковій ділянці ДЛМ, ініціюють розвиток стійкої мітохондріальної дисфункції з подальшим енергодефіцитом нейрона [Беленичев И.Ф. и соавт., 2010, Супрун Э.В. и соавт., 2010]. В цілому виникає замкнуте коло, коли брак кисню порушує енергообмін і стимулює утворення АФК, які ушкоджують мембрани мітохондрій і лізосом, що може призвести до мітохондріальної дисфункції.

Встановлено, що комбіноване введення метилпреднізолону з цитиколіном статистично значимо знижувало прояви мітохондріальної дисфункції: введення комбінації метилпреднізолону і цитиколіну призводило до достовірного зниження

швидкості відкриття мітохондріальної пори на 66 % ($p < 0,05$) і підвищенню заряду внутрішньої мембрани мітохондрії на 69% ($p < 0,05$) (табл. 4).

Таблиця 4

Прояви явищ мітохондріальної дисфункції у тварин з ЕАЕ за умов застосування комбінації «метилпреднізолон + цитиколін», $M \pm m$, $n=10$

<i>Групи тварин</i>	<i>Відкривання пори (циклоспорин-А-чутливе поглинання, 540 нм)</i>	<i>Мембранний заряд, сафронін –О, Ψ</i>
Пасивний контроль (інтактні)	$0,019 \pm 0,001$	$50,9 \pm 2,05$
Активний контроль (ЕАЕ)	$0,193^* \pm 0,013$ (+915%)	$10,9^* \pm 1,21$ (-78%)
ЕАЕ + метилпреднізолон	$0,186 \pm 0,015$	$13,0 \pm 1,21$
ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін	$0,065^{**} \pm 0,005$ (-66%)	$18,5^{**} \pm 1,8$ (+69%)

Примітки: * - $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю (інтактні);

** - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю (ЕАЕ).

Оптимізація процесів окислювального фосфорилування у мітохондріях за умов введення дослідних препаратів сприяла відновленню енергозабезпечення, а саме зростанню рівнів АТФ та АДФ на тлі зменшення вмісту АМФ. При чому встановлено, що введення комбінації метилпреднізолону і цитиколіну запобігало зниженню швидкості процесів мітохондріального дихання, підвищувало рівень «заповнення» системи АТФ-АДФ-АМФ високоенергетичними фосфатними зв'язками, сприяло активізації процесів утворення АТФ із АДФ, коригувало співвідношення окремо взятих макроергічних фосфатів та інтенсивність реакцій фосфорилування. При цьому дані явища спостерігаються за умов збереженої переваги енергозатратних процесів над процесами енергозабезпечення.

Передумовами значної метаболічної активності цитиколіну, можливо, є стимуляція реакцій аеробного гліколізу, оптимізація процесів аеробного метаболізму пірувату у циклі Кребса, активізація функціонування малат-аспартатного човникового механізму завдяки зростанню рівнів аспартату, який приймає участь у функціонуванні «малат-аспартатного» шунта, залучається до циклу трикарбонових кислот і сприяє зростанню синтезу макроергів [Никонов В.В. та співавт. 2011, Belenichev I.F. et al., 2012]. Слід зазначити, що процеси аеробного метаболізму піровиноградної кислоти у циклі трикарбонових кислот у мозковій тканині пов'язані з піруватдегідрогеназною реакцією, яка дає початок для біосинтезу ацетилхоліну – одного з ключових нейромедіторів, який відіграє значну роль у когнітивних функціях [Болдырев А.А. та соавт., 2010].

Отже, за умов експериментально відтвореного розсіяного склерозу посилення нейропротективного ефекту спільного введення метилпреднізолону з цитиколіном можна пояснити через призму NO-залежних механізмів нейроапоптозу та мітохондріальної дисфункції. Ймовірно, ефекти цитиколіну і метилпреднізолону

при ЕАЕ направлені на спільне пригнічення експресії і активності iNOS [Беленичев И.Ф. и соавт., 2015; Belenichev I.F. et al., 2014].

Оцінка гістоморфометричних показників тканин головного мозку щурів з ЕАЕ при використанні комбінації-лідера «метилпреднізолон + цитиколін». Незаперечним підтвердженням нейропротективного ефекту сумісного введення метилпреднізолону з цитиколіном є результати аналізу їх впливу на гістоморфометричні показники нейронів кори головного мозку та ультраструктурну організацію неокортексу та гіпокампа у тварин з ЕАЕ (табл. 5, рис. 5-6).

Таблиця 5

Оцінка морфо-функціональних показників нейронів сенсомоторної зони головного мозку білих щурів за умов ЕАЕ, $M \pm m$, $n=10$

Умови експерименту	Щільність нейронів (нейрон/ mm^2)	Площа нейронів (mkm^2)	Вміст РНК (E_{on})
Пасивний контроль (інтактні)	$1250,2 \pm 25,5$	$83,0 \pm 3,86$	$9,52 \pm 0,33$
Активний контроль (ЕАЕ)	$1006,7^* \pm 10,7$ (-19%)	$91,5 \pm 3,93$ (+10%)	$7,45^* \pm 0,62$ (-21%)
ЕАЕ + метилпреднізолон	$1037,4^{**} \pm 6,8$ (+3%)	$84,2^{**} \pm 2,73$ (-8%)	$7,33 \pm 0,44$ (-2%)
ЕАЕ + метилпреднізолон + цитиколін	$1101,4^{**} \pm 7,4$ (+9,4%)	$84,2^{**} \pm 2,11$ (-8%)	$8,10 \pm 0,42$ +8,7%

Примітки: * - $p < 0,05$ по відношенню до показників пасивного контролю (інтактні);

** - $p < 0,05$ по відношенню до показників активного контролю (ЕАЕ).

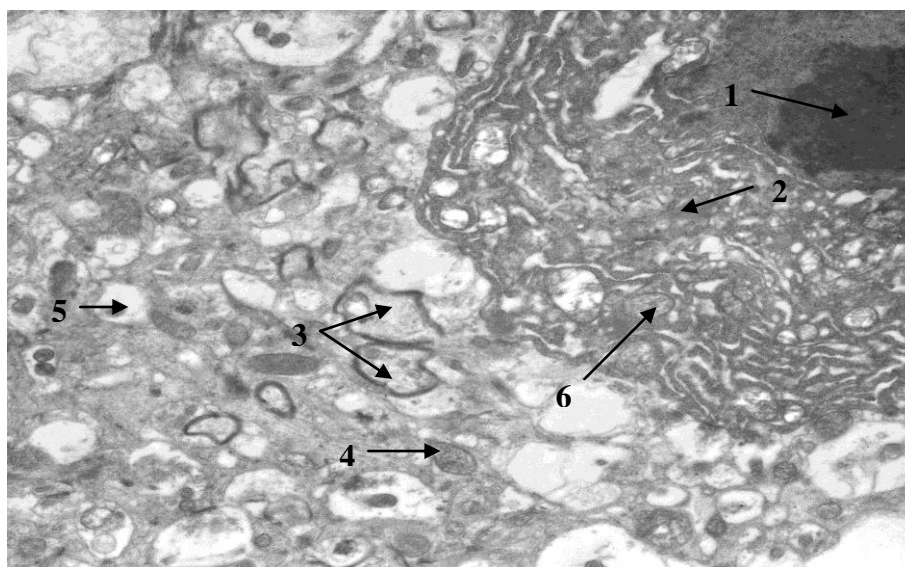


Рис. 5. Електронограма зрізу кори фронтальної долі головного мозку щура групи ЕАЕ + М + цитиколін. 36. x 10000.

Позначення:

1. ядро нейрона;
2. розвинута хроматофінна субстанція;
3. мієлінові нервові волокна;
4. безмієлінові нервові волокна;
5. відсутність нейрофіламентів;
6. мітохондрія

Визначено, що цитиколін покращує морфо-функціональний стан нейронів, глії і синаптичного апарату у цих мозкових утвореннях, що сприяє активації механізмів адаптації і запобігає процесам ушкодження нейроцитів та їх подальшому апоптозу. Зокрема, у щурів з експериментальною патологією, які отримували комбінацію метилпреднізолону і цитиколіну, щільність нейронів підвищилася на 9,4% ($p < 0,05$), а їх площа досягла значень інтактних тварин; при цьому концентрація РНК зросла на 8,7%. До того ж, за даних умов експерименту щільність апоптичних та деструктивних клітин зменшилася на 19,5% ($p < 0,05$), а частка апоптичних нейронів знизилася на 42% ($p < 0,05$) (табл. 5).

Доцільність нейропротекторної терапії за умов ЕАЕ нами підтверджена при ультраструктурному дослідженні неокортексу та гіпокампу. Результати дослідження продемонстрували зниження ступеню набряку цитоплазми олігодендроцитів; зменшення обсягу патологічних змін в мітохондріях; відновлення електронної щільності цитоплазми та кількості рибосом до норми; нормалізацію структурної організації ядер нейронів, які можуть розцінюватись як маркери компенсаторної дії цитиколіну на нейрони за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу (рис. 5 – 6).

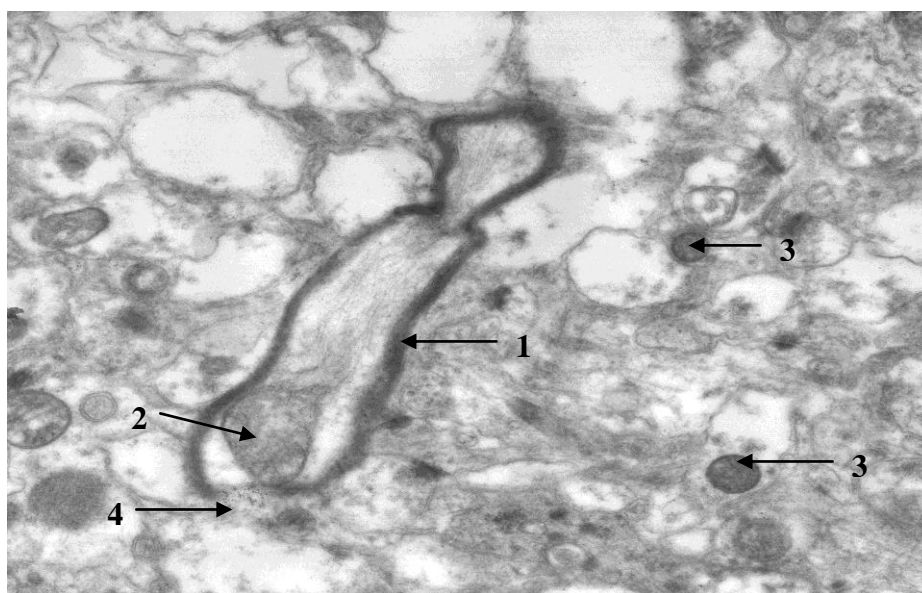


Рис. 6. Електронограма зрізу гіпокампу головного мозку щура групи ЕАЕ + М + цитиколін. Зб. х 24000.

Позначення:

1. мієлінова оболонка нервового волокна;
2. аксон;
3. мітохондрія;
4. ділянка демієлінізації.

За результатами кореляційно-регресійного аналізу було встановлено, що на щільність нейронів виявлено різний ступінь впливу прямої залежності з боку показників потенціалу мембрани мітохондрії, щільності апоптичних і деструктивних клітин та результатів латентного періоду УРПУ. Такий аналіз дав змогу відкинути ті фактори, які мають незначний вплив на результуючу величину.

Комп'ютерне прогнозування можливості комбінованого використання метилпреднізолону та цитиколіну за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу. Прогнозуванням фармакологічної взаємодії зазначених компонентів показано, що вона може розвиватися на рівні зміни фармакокінетики інгредієнтів і їх фармакодинаміки (вплив на суміжні або однакові рецепторні системи, потенціювання або зменшення фармакологічної відповіді через функціональний антагонізм тощо) [Головенко Н.Я., 2004]. Доведено, що в представленій комбінації «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі) і на рівні фармакокінетичних стадій. Крім того, від спільного застосування метилпреднізолону з цитиколіном слід очікувати посилення його стимулюючої дії. Виходячи з відмінностей в періодах напіввиведення, а також непрямого (опосередковано через метаболічні процеси) механізми розвитку терапевтичного ефекту розглянутих сполук, з фармакокінетичної точки зору комбінація метилпреднізолону з цитиколіном є безпечною та ефективною.

Таким чином, експериментальний алергічний енцефаломієліт, індукований у нелінійних білих щурів, є найбільш адекватною моделлю розсіяного склерозу й супроводжується цілим рядом змін запального характеру із залученням у патологічний процес практично всіх систем регуляції гомеостазу організму. Виявлені та встановлені закономірності фармакологічної активності досліджених тест-зразків за умов ЕАЕ є передумовою вибору оптимального препарату або ж комбінації засобів для забезпечення адекватної та повноцінної фармакологічної корекції больового синдрому та медикаментозного захисту мозку у хворих на розсіяний склероз.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі проведений порівняльний системний аналіз нейротропної активності класичних та ад'ювантних анальгетиків і засобів медикаментозного захисту мозку, а також наведено експериментально-теоретичне обґрунтування шляхів оптимізації терапевтичних стратегій больового синдрому за умов ЕАЕ з акцентом на терапію нейродегенеративних порушень когнітивних функцій при розсіяному склерозі.

1. За умов демієлінізуючої патології на фоні базової гормонотерапії мелоксикам виявляє максимально виражений рівень болетамуючої дії, підвищуючи больовий поріг майже в 4 рази ($p < 0,05$) в порівнянні з групою ЕАЕ та достовірно значимо знижуючи активність PGH-синтази в головному (- 51%, $p < 0,05$) та спинному (- 47,4%, $p < 0,05$) мозку.

2. Для корекції як хронічного, так і невропатичного больового синдрому на фоні базової фармакотерапії метилпреднізолоном в ряду ад'ювантних анальгетиків доцільно рекомендувати антиконвульсант габапентин, який виявляє виражену знеболюючу активність за умов модельованої патології, збільшуючи поріг ноцицепції в 2,5 рази ($p \leq 0,05$).

3. Застосування лікарських засобів з нейропротективною активністю здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість тварин з важким перебігом ЕАЕ. Найбільш оптимальним засобом нейропротекції при ЕАЕ за умов терапії метилпреднізолоном є цитиколін, який найбільш ефективно попереджає розвиток неврологічних порушень і статистично достовірно, в 3,3 - 4 рази ($p < 0,05$) порівняно з групою контролю зменшує тяжкість і тривалість перебігу експериментального еквіваленту розсіяного склерозу у тварин.

4. В комбінаціях «метилпреднізолон-мелоксикам», «метилпреднізолон-габапентин» і «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі), так і на рівні фармакокінетичних взаємодій. З урахуванням відмінностей в періодах напіввиведення, а також непрямому механізмі розвитку терапевтичного ефекту досліджених сполук з фармакокінетичної точки зору найбільш доцільною є комбінація метилпреднізолону з цитиколіном.

5. Експериментальний алергічний енцефаломієліт викликає ультраструктурні зміни нейронального, гліального і синаптичного апарата, які є основою деструкції нейронів і подальшої ініціалізації процесів їх апоптозу в неокортексі і гіпокампі експериментальних тварин. Курсова нейропротективна терапія не забезпечує повного відновлення ультраструктурних змін мозку, проте збільшує щільність упаковки синаптичних везикул і сприяє стабілізації структури пресинаптичної та постсинаптичної мембран, активує компенсаторно-адаптаційні процеси в нейрональних і гліальних клітинах, а також стабілізує стан гематомікроциркуляторного русла.

6. Фармакологічний аналіз антиноцицептивної та нейропротективної активності комбінованого застосування класичних та ад'ювантних знеболюючих засобів і засобів медикаментозного захисту мозку з метилпреднізолоном як препаратом базової гормонотерапії за умов експериментального алергічного енцефаломієліту дозволив визначити ефективні та раціональні напрямки фармакотерапії больового синдрому шляхом застосування комбінацій «метилпреднізолон-мелоксикам» і «метилпреднізолон-габапентин», які сприяють збереженню достатнього антиноцицептивного потенціалу мелоксикаму та габапентину, а також встановити стратегічний напрямок нейропротективної терапії ЕАЕ завдяки композиції «метилпреднізолон-цитиколін», що сприяє гальмуванню біодеградації сфінгомієліну і кардіоліпіну, відновлює активність глутатіонредуктази, стимулюючи синтез глутатіона і виявляючи антиапоптичний ефект.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для усунення і/або ослаблення ноцицептивних больових синдромів при РС доцільно застосовувати нестероїдні протизапальні препарати, з метою зменшення побічних ефектів яких (ульцерогенна дія, підвищення рівня глікемії тощо) рекомендоване використання селективних блокаторів циклооксигенази 2 типу, зокрема, мелоксикаму.

2. Терапію невропатичних больових синдромів у хворих на РС рекомендується проводити призначенням ад'ювантних анальгетиків, зокрема, прегабаліну. Водночас необхідно враховувати, що антиконвульсанти не виявляють достатньої специфічності для блокування тільки ноцицептивного сигналу, і можуть посилювати симптоми слабості і атаксії у хворих на розсіяний склероз
3. Для профілактики та лікування когнітивної дисфункції та неврологічного дефіциту як проявів нейродегенерації у хворих на РС може бути рекомендоване призначення цитиколіну на фоні використання метилпреднізолону як засобу базової гормонотерапії даної патології.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Нефьодов О.О. Роль імунотерапії у хворих на розсіяний склероз в практиці сімейного лікаря / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, О.І. Корсунська, О.І. Кальбус // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.1 (113). – С. 25-30. *(Особистий внесок дисертанта: пошук наукової інформації, участь у її аналізі і узагальненні, формулювання висновків)*
2. Нефьодов О.О. Моделювання та оцінка перебігу експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, Ю.В. Харченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.2 (114). – С. 205-208. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
3. Нефьодов О.О. Вплив знеболюючих засобів на дослідно-орієнтовну функцію ЦНС у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Світ медицини та біології. – 2014. - №4 (46). – С. 135-139.
4. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу неопіоїдних анальгетиків за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – вип.4, Т.4 (116). – С. 108-111.
5. Нефьодов О.О. Порівняльна оцінка впливу ненаркотичних анальгетиків та засобів ад'ювантної терапії на поведінкові реакції щурів за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. - №6 (41). – С. 37-43.
6. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции болевого синдрома при рассеянном склерозе (обзор литературы) / А.А. Нефедов // Буковинський медичний вісник. – 2015.- Т. 19, №1 (73). – С. 232-236.
7. Нефедов А.А. Опыт применения цитиколина в экспериментальной терапии моделированного аллергического энцефаломиелимита / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.2, Т. 4 (121). – С. 165-170. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці концепції роботи, проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
8. Нефьодов О.О. Зміни анальгетичного потенціалу антиконвульсантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур

// Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.3, Т. 1 (122). – С. 161-164. *(Особистий внесок дисертанта: участь у проведенні експерименту, систематизація отриманих даних, формулювання висновків і подальших перспектив, оформлення статті до друку)*

9. Нефедов А.А. Возможности фармакологической коррекции когнитивных расстройств в условиях экспериментального эквивалента рассеянного склероза / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №2. – С. 4-11. *(Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та протоколу дослідження, участь у виконанні експерименту, комплексна оцінка результатів, їх статистична обробка та аналіз, формулювання висновків)*

10. Нефедов О.О. Зміни антиноцицептивного потенціалу комбінацій анальгетиків з метилпреднізолоном за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефедов, В.Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - №1(25). - С. 35-38. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*

11. Нефедов О.О. Зміни ноцицептивного потенціалу та активності PGH-синтетази за умов експериментального еквівалента розсіяного склерозу / О.О. Нефедов, В.Й. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2015. – Т.19, №3 (75). – С. 114-117. *(Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*

12. Нефедов О.О. Фармакотерапія розсіяного склерозу – сучасні стандарти / О.О. Нефедов, В.Й. Мамчур // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - №3 (44). – С. 10-16. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз літературних джерел, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*

13. Нефедов О.О. Вплив засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу на орієнтовно-дослідницьку активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом у тесті «відкрите поле» / О.О. Нефедов // Одеський медичний журнал. – 2015. - №5 (151). – С. 14-19.

14. Нефедов О.О. Антидепресанти: знеболююча активність за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефедов // Актуальні проблеми сучасної медицини: ВІСНИК Української медичної стоматологічної академії. – 2015. – Т.15, вип. 3(51), Ч.1. – С. 225-228.

15. Nefedov Aleksandr Pharmacological aspects of the use of anticonvulsants as a means of therapy of neuropathic pain syndrome in experimental allergic encephalomyelitis / Aleksandr Nefedov, Vitalii Mamchur // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2015. - № 5. - P. 118-125. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку)*

16. Нефедов О.О. Експериментальний алергічний енцефаломієліт: особливості знеболюючої терапії та місце антиконвульсантів у якості анальгетиків / О.О. Нефедов, В.Й. Мамчур // Медичні перспективи. – 2015. – Т. XX, №4. – С. 4-9. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка*

та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)

17. Нефьодов О.О. Зміни рухово-дослідницької поведінки тварин під впливом антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Світ медицини та біології. -2015. - №4(54). – С. 131-134.

18. Нефьодов О.О. Порівняльна характеристика болезаспокійливої активності протисудомних засобів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур // Досягнення біології та медицини. - 2015. - № 2 (26). - С. 45-47. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*

19. Нефьодов О.О. Нейротропні ефекти антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. - №6 (46). – С. 28-33.

20. Nefedov A.A. Pharmacological Correction of Neurological Disorders in Case of Multiple Sclerosis / A.A. Nefedov, V.I. Mamchur // Galician Medical Journal. – 2015. – Vol. 22, N 4, part 2. – P. 39-41. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*

21. Нефедов А.А. Оценка эффективности нейротропной терапии экспериментального аллергического энцефаломиелита в условиях базовой терапии солу-медролом / А.А. Нефедов // Biomedical and Biosocial Antropology. – 2015. - №24. – С. 65-70.

22. Нефьодов О.О. Біофармацевтичний аналіз взаємодії мелоксикаму та метилпреднізолону – компонентів фармакотерапії больового синдрому та демієлінізуючої патології / О.О. Нефьодов, В.Б. Ларіонов, М.Я. Головенко, В.Й. Мамчур // Журнал Національної академії медичних наук. – 2015. - Т.21, №3-4. – С. 398-403. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, участь у проведенні експерименту, статистична обробка отриманих даних)*

23. Нефьодов О.О. Оцінка змін рухової та емоційної активності щурів під впливом антиконвульсантів за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2016. - №1(73). – С. 12-18.

24. Нефедов А.А. Оценка антиноцицептивного потенциала антидепрессантов в терапии невропатической боли, индуцированной экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Буковинський медичний вісник. – 2016. – Т.20, №1 (77). – С. 94-98. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку)*

25. Нефедов А. Изучение влияния комбинированного использования метилпреднизолона с цитиколином на процессы энергообеспечения митохондрий нейронов коры головного мозга и гистоморфометрические показатели его

- образований в условиях рассеянного склероза в эксперименте / А. Нефедов, В. Мамчур // Modern Science - Moderní věda. - Praha. - Česká republika, Nemoros. - 2016. - №1. - Р. 142-156. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних, підготовка статті до друку)*
26. Нефедов А.А. Особенности ультраструктуры фронтальной коры и гиппокампа крыс в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур, И.В. Твердохлеб // Morphologia. – 2016. – Т.10, №1. – С. 54-61. *(Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та протоколу дослідження, участь у виконанні експерименту, комплексна оцінка результатів, їх статистична обробка та аналіз, формулювання висновків)*
27. Nefedov Alexander A. Pharmacological Analysis of Neuroprotective Action of Methylprednisolone with Citicoline in Conditions of Experimental Allergic Encephalomyelitis / Alexander A. Nefedov, Vitaly I. Mamchur, Andrey V. Abramov, Nina V. Bukhtiyarova // Biological Markers and Guided Therapy. – 2016. – Vol.3, N1. – Р. 115-124. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції, методології виконання експерименту, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*
28. Нефедов А.А. Применение цитиколина для коррекции ультраструктурных изменений ЦНС, индуцированных экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур // Вісник проблем біології і медицини. – 2016. – Вип.2, Т.2 (129). – С. 235-240. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення результатів експерименту, участь у розробці загальної концепції роботи)*
29. Нефедов А.А. Прогнозирование в экспериментах in silico взаимодействия габапентина с метилпреднизолоном как средств комбинированной терапии демиелинизирующих заболеваний / А.А. Нефедов, В.И. Мамчур, В.Б. Ларионов, В.С. Смандич // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2016. - №2 (48). – С. 67-73. *(Особистий внесок дисертанта: пошук літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
30. Нефедов О.О. Комп'ютерне моделювання сумісного використання цитиколіну з метилпреднізолоном за умов фармакотерапії розсіяного склерозу / О.О. Нефедов, В.И. Мамчур, В.Б. Ларіонов, С.М. Дронов // Світ медицини та біології. - 2016. - №2(56). – С. 52-58. *(Особистий внесок дисертанта: статистична обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка статті до друку)*
31. Корсунська О.І. Імунотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О.І. Корсунська, О.О. Нефедов. – Дніпропетровськ: «Літограф», 2015. – 203 с. *(Особистий внесок дисертанта: аналіз і узагальнення літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*
32. Пат. 111354 Україна, МПК А 61 К 31/00, А 61 Р 25/00. Спосіб лікування розсіяного склерозу / Нефедов О.О., Мамчур В.И., Дронов С.М., Макаренко О.В.; заявник та патентовласник Нефедов Олександр Олександрович, Мамчур Віталій Йосипович, Дронов Сергій Миколайович, Макаренко Ольга Володимирівна – № и

201604214 ; заявл. 18.04.16; опубл. 10.11.2016, Бюл. №21. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних)*

33. Нефьодов О.О. Особливості використання ад'ювантної знеболюючої терапії за умов розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 2 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с. *(Особистий внесок дисертанта: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовка до друку)*

34. Нефьодов О.О. Застосування цитиколіну як спосіб підвищення ефективності базової гормонотерапії розсіяного склерозу (експериментальне дослідження) : інформаційний лист. – Вип. 8 з проблеми «Фармакологія» / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур. – К. : Укрмедпатентінформ, 2015. – 4 с. *(Особистий внесок дисертанта: участь у розробці загальної концепції роботи, проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних)*

35. А. с. 60033 Україна. Імуноотропні препарати у роботі лікаря загальної практики (фармакотерапевтичний довідник) / О. І. Корсунська, О. О. Нефьодов (Україна). – Заявл. 08.04.2015 ; опубл. 05.06.2015. *(Особистий внесок дисертанта: пошук літературних джерел, участь у розробці загальної концепції роботи)*

36. Nefedov A.A. The pain syndrome in multiple sclerosis / A.A. Nefedov // Матеріали науково-практичної конференції «Наукові розробки, передові технології, інновації», 02-05 травня 2014 року. – Будапешт-Прага-Київ, - К.: КНЛУ, НДІР. – С. 178-179.

37. Нефьодов О.О. Фармакотерапевтична корекція больових синдромів при розсіяному склерозі / О.О. Нефьодов // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.», 30-31 травня 2014 року. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота». – С. 102-104.

38. Нефьодов О.О. Фармакологічний аналіз терапії болю за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали XV конгресу СФУЛТ, 16-18 жовтня 2014 р., Чернівці-Київ-Чикаго. – С. 365.

39. Нефедов А.А. Моделирование экспериментального аллергического энцефаломиелимита как наиболее адекватной модели рассеянного склероза / А.А. Нефедов // Материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика АМН СССР Артура Викторовича Вальдмана «Инновации в фармакологии: от теории к практике», Санкт-Петербург, 27-28 октября 2014 года, тезисы / Под редакцией С.Б. Середенина, Н.Г. Незнанова, Э.Э. Звартау; - Санкт-Петербург. – 2014. – С. 129.

40. Нефьодов О.О. Експериментальне дослідження ненаркотичного анальгетика мелоксикама на поведінкові реакції у щурів із експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, Д.Г. Вернигора // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та практичної медицини», 23-24 квітня 2015 р. – Суми. – С. 172. *(Особистий внесок дисертанта: розробка загальної концепції та схеми проведення наукової роботи, виконання експерименту)*

41. Нефьодов О.О. Дослідження анальгетичних властивостей кеторолаку за умов експериментальних еквівалентів розсіяного склерозу // О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, Д.Г. Вернигора // Матеріали міжнародної науково-методичної конференції «Актуальні питання медицини», 27 березня 2015 р. – Дніпропетровськ. – С. 171-173.
42. Нефьодов О.О. Експериментальне дослідження знеболюючого потенціалу неопіоїдних анальгетиків за умов експериментальної патології ЦНС / О.О. Нефьодов, О.В. Кулик, В.В. Кривошей // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Медична наука та практика в умовах сучасних трансформаційних процесів», 24-25 квітня 2015 року. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота». – С. 94-95.
43. Нефьодов О.О. Вивчення впливу антиконвульсанта габапентину на поведінкові реакції у щурів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали II міжнародної науково-практичної конференції «Фундаментальна та клінічна медицина», 20-22 травня 2015 р. – Київ, 2015. – С. 45-46.
44. Нефьодов О.О. Аналіз впливу цитиколіну на безумовно-рефлекторну активність щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом / О.О. Нефьодов // Хист. – 2015. – вип. 17. – С. 378.
45. Нефьодов О.О. Дослідження впливу амітриптиліну на поведінкові реакції в щурів у тесті «відкрите поле» за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов // Матеріали II науково-практичної конференції з міжнародною участю «Природничі читання», 14-17 травня 2015 року. – Чернівці, 2015. – С. 179-180.
46. Нефьодов О.О. Вивчення впливу α -ліпоевої кислоти на поведінкові реакції у щурів з експериментальним еквівалентом розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кулик // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2015. - №1 (22). – С. 151.
47. Нефьодов О.О. Дослідження впливу лорноксикаму на дослідно-орієнтовану функцію ЦНС у щурів за умов експериментального моделювання розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвяченої Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2015», 14-15 травня 2015 р. – Запоріжжя. – С. 30.
48. Nefedov A.A. Experimental analysis of neuroprotective agent in cognitive deficiency development in the modeling of multiple sclerosis / A.A. Nefedov, O.V. Khomiak, E.Y. Kovalenko // Abstract book 8 International Scientific Interdisciplinary Conference for medical students and young scientists, 14-15 may 2015. – Kharkiv. – 2015. – P. 198.
49. Нефьодов О.О. Оцінка знеболюючого потенціалу парацетамолу за умов експериментального алергічного енцефаломієліту / О.О. Нефьодов, О.В. Руденко // Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених НМАПО імені П. Л. Шупика, присвяченої «Дню науки» «Інновації молодих вчених медиків і

їх впровадження в практичну охорону здоров'я», 30 квітня 2015 року. – Київ. – С. 47-48.

50. Нефьодов О.О. Особливості антиноцицептивних ефектів антидепресантів за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кривошей // Матеріали наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання сучасної медицини: наукові дискусії», 23-24 жовтня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 98-100.

51. Нефьодов О.О. Розсіяний склероз: патогенетичні механізми розвитку та особливості перебігу в експерименті / О.О. Нефьодов, В.Й. Мамчур, С.М. Дронов, О.В. Кривошей // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Економічний розвиток: теорія, методологія, управління», 1-9 листопада 2015 р. – Будапешт-Прага-Київ, 2015. – С. 159-166.

52. Нефьодов О.О. Місце антиконвульсанта топірамата у знеболенні при розсіяному склерозі / О.О. Нефьодов, О.В. Руденко // Матеріали VIII Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення клінічної фармакології та фармакотерапії», 9-10 листопада 2015 р. – Вінниця, 2015. – С. 193-194.

53. Нефьодов О.О. Дослідження місця габапентину та прегабаліну при ноцицепції за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов // Матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології», 22-23 жовтня 2015 р. – К.: вид-во «Мегапринт», 2015. – С. 81-82.

54. Нефедов А.А. Изучение анальгетического потенциала антидепрессанта в терапии невропатического болевого синдрома в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита / А.А. Нефедов, Н.А. Ковтуненко, Л.А. Легкая // Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні погляди на актуальні питання теоретичної, експериментальної та практичної медицини», 18-19 грудня 2015 року. – Одеса. –С. 120-122.

55. Нефьодов О.О. Експериментальна оцінка впливу антиконвульсантів габапентину та прегабаліну на поведінкові реакції в тесті «відкрите поле» за умов розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.В. Кривошей, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова // Матеріали наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні тенденції розвитку медичної науки та медичної практики», 25-26 грудня 2015 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2015. – С. 140-141.

56. Нефьодов О.О. Фармакокінетичні особливості вибору знеболюючого засобу за умов експериментального розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, С.М. Дронов, В.С. Смандич, О.В. Кулик // Матеріали XXXIII Всеукр. наук.-практ. конф. за участю міжнар. спеціалістів «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів», 08 квітня 2016 року. – Х. : НФаУ, 2016. – С. 143-144.

57. Нефьодов О.О. Вивчення біофармацевтичної взаємодії антиконвульсанта з глюкокортикостероїдом за умов експериментального еквіваленту розсіяного склерозу / О.О. Нефьодов, О.А. Музичок, О.І. Денисенкова, О.В. Кулик // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам'яті

професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології», 24-25 листопада 2016 р. – Запоріжжя, 2016. – С. 59-60.

АНОТАЦІЯ

Нефьодов О.О. Фармакологічний аналіз нейропротекції за умов експериментального алергічного енцефаломієліту. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. ДУ «Інститут фармакології і токсикології НАМН України», Київ – 2017.

Дисертаційна робота присвячена експериментальному вирішенню проблеми медикаментозного знеболення та нейропротекції при експериментальному моделюванні розсіяного склерозу.

Аналізом спектру антиноцицептивної активності показано, що за умов експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) на фоні терапії метилпреднізолоном, для медикаментозної корекції соматичного больового синдрому доцільно рекомендувати мелоксикам, а невропатичного - габапентин та прегабалін.

Доведено, що застосування лікарських засобів нейропротективно-антиоксидантного комплексу здатне попереджувати летальні випадки, гальмувати розвиток неврологічних розладів або ж зменшувати кількість тварин з важким перебігом ЕАЕ. Найбільш оптимальним засобом нейропротекції при ЕАЕ за умов терапії метилпреднізолоном є цитиколін.

В комбінаціях «метилпреднізолон-мелоксикам», «метилпреднізолон-габапентин» і «метилпреднізолон-цитиколін» відсутні можливі взаємодії як на фізико-хімічному рівні (при комбінації в лікарській формі), так і на рівні фармакокінетичних взаємодій.

Проведені дослідження дозволяють обґрунтувати доцільність знеболюючої та нейропротекторної терапії та підвищення її якості у хворих на розсіяний склероз на фоні терапії глюкокортикоїдами за рахунок створення фіксованих комбінацій лікарських засобів.

Ключові слова: розсіяний склероз, експериментальний алергічний енцефаломієліт, неопіїдні анальгетики, знеболення, демієлінізація, нейропротектори, ад'ювантна терапія.

SUMMARY

Nefedov O.O. Pharmacological analysis of neuroprotection in conditions of experimental allergic encephalomyelitis. – Manuscript.

Dissertation for academic degree of doctor of medical sciences in specialty 14.03.05. – Pharmacology. SI «Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv – 2017.

The thesis is devoted to the experimental solution of the problem of analgesia and neuroprotection in the experimental modeling of multiple sclerosis.

Analysis of antinociceptive activity spectrum shows that in the conditions of demyelinating disease (experimental allergic encephalomyelitis) during basic hormone pharmacotherapy meloxicam should be considered as a drug of choice for the correction of somatic pain, which showed a high level of analgesic effect and significantly reduced the activity of PGH-synthase in the brain and spinal cord.

It was found that for the correction of neuropathic pain syndrome on the background of basic pharmacotherapy with methylprednisolone it is appropriate to recommend adjuvant analgesics, in particular, anticonvulsants gabapentin and pregabalin, which exhibit a pronounced analgesic activity in the conditions of simulated disease. As evidenced by our results, after the course of administration of anticonvulsants or antidepressants during mechanical stimulation of the hind limb, an increase in the threshold of tactile sensitivity was recorded. The ability to reduce the severity of tactile allodynia was decreased in the following order: gabapentin (-79%, $p < 0,05$) \geq pregabalin (70%, $p < 0,05$) $>$ sodium valproate (-42%, $p < 0,05$) \geq topiramate (-37%, $p > 0,05$) $>$ carbamazepine (-23%, $p > 0,05$). Wherein a statistically significant increase of allodynia threshold as compared to that of active control under the influence of antidepressants was recorded only in animals that were treated with amitriptyline and trazodone (-60%, $p < 0,05$ and -40%, $p < 0,05$ respectively).

It has been proved that the use of drugs of the neuroprotective-antioxidant complex can prevent lethal cases, inhibit the development of neurological disorders or reduce the number of animals with severe experimental allergic encephalomyelitis. The most optimal drug for neuroprotection in experimental allergic encephalomyelitis in the conditions of treatment with methylprednisolone is citicoline which effectively prevented the development of neurological disorders and significantly 3,3-4-fold ($p < 0,05$) reduces the severity and duration of experimental multiple sclerosis in animals as compared with the control group.

Confirmation of the neuroprotective effect of co-administration of methylprednisolone with citicoline are the results of the analysis of their impact on the histo-morphometric parameters of neurons in cerebral cortex and the ultrastructural organization of the neocortex and hippocampus in animals with experimental allergic encephalomyelitis. It was determined that citicoline improves the morpho-functional state of neurons, glia and synaptic apparatus in these brain formations, promotes activation of adaptation mechanisms, and prevents neuronal damage and their further apoptosis. In particular, in rats with experimental pathology that received a combination of methylprednisolone and citicoline, neuronal density increased by 9,4% ($p < 0,05$), and their area reached the values of intact animals, while the RNA concentration increased by 8,7%. In addition, under the given experimental conditions, the density of apoptotic and destructive cells decreased by 19,5% ($p < 0,05$), and the proportion of apoptotic neurons decreased by 42% ($p < 0,05$). At the same time, ultramicroscopic studies of the cortex of the anterior lobe and hippocampus of the rat brain under administration of methylprednisolone and citicoline in conditions of experimental allergic encephalomyelitis demonstrated a decrease in the degree of edema of the oligodendrocyte cytoplasm, decrease in the volume of pathological changes in mitochondria, restoration of the cytoplasm electron density and the amount of ribosomes to normal values, normalization of the structural organization

of the nuclei of neurons, which can be regarded as markers of the compensatory action of citicoline on neurons under the experimental equivalent of multiple sclerosis.

In the combinations "methylprednisolone-meloxicam", "gabapentin-methylprednisolone" and "methylprednisolone-citicoline" there are no possible interactions both at physical and chemical level (when combined in the dosage form), and at the level of pharmacokinetic interactions. Adjacent pharmacological spectrum of methylprednisolone and meloxicam involves an increased risk of side effects associated with hyperinhibition of biosynthesis of prostaglandins and cyclooxygenases biosynthesis, but their synergistic action allows to reduce the dose of ingredients in a combination of the drugs. In addition, from the joint use of methylprednisolone with citicoline one should expect an increase in its stimulatory effect. Based on the differences in the half-life, indirect (through metabolic processes) mechanism of development of the therapeutic effect of the examined compounds, as well as from the pharmacokinetic point of view, the combination of methylprednisolone with citicoline is safe and effective.

Experimental allergic encephalomyelitis causes ultrastructural changes of neuronal, glial and synaptic apparatus, which are the basis of the destruction of neurons and the subsequent initialization process of apoptosis in the neocortex and hippocampus of experimental animals. Course neuroprotective therapy does not provide a complete recovery of ultrastructural changes in the brain, however, increases the packing density of synaptic vesicles, and helps to stabilize the structure of the presynaptic and postsynaptic membranes, activates the compensatory-adaptive processes in neuronal and glial cells, as well as stabilizes the state of microvasculature.

Pharmacological analysis of antinociceptive and neuroprotective activity of the combined use of classical and adjuvant analgesics and the drugs for brain protection with methylprednisolone as the drug of basic hormone pharmacotherapy in conditions of experimental equivalent of multiple sclerosis allowed to determine the effective and efficient direction of pharmacotherapy of pain syndrome through the use of combinations of "methylprednisolone-meloxicam" and "methylprednisolone-gabapentin", which contribute to the preservation of sufficient antinociceptive potential of meloxicam and gabapentin. Also this allowed to establish strategic direction of neuroprotective therapy of experimental allergic encephalomyelitis due to combination "methylprednisolone-citicoline" that contributes to the inhibition of the biodegradation of sphingomyelin and cardiolipin, restores the activity of glutathione reductase, stimulating glutathione synthesis and exhibiting anti-apoptotic effect.

Key words: multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis, non-opioid analgesics, anesthesia, demyelination, neuroprotectors, adjuvant therapy.

АННОТАЦИЯ

Нефедов А.А. Фармакологический анализ нейропротекции в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.03.05 - фармакология. ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев - 2017.

Диссертационная работа посвящена экспериментальному решению проблемы медикаментозного обезболивания и нейропротекции при экспериментальном моделировании рассеянного склероза.

Анализом спектра антиноцицептивной активности показано, что в условиях экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) на фоне терапии метилпреднизолоном, для медикаментозной коррекции соматического болевого синдрома целесообразно рекомендовать мелоксикам, а невропатического - габапентин и прегабалин.

Доказано, что применение лекарственных средств нейропротективно-антиоксидантного комплекса способно предупреждать летальные случаи, тормозить развитие неврологических расстройств или уменьшать количество животных с тяжелым течением ЭАЭ. Наиболее оптимальным средством нейропротекции при ЭАЭ в условиях терапии метилпреднизолоном является цитиколин.

В комбинациях «метилпреднизолон-мелоксикам», «метилпреднизолон-габапентин» и «метилпреднизолон-цитиколин» отсутствуют возможные взаимодействия как на физико-химическом уровне (при комбинации в лекарственной форме), так и на уровне фармакокинетических взаимодействий.

Проведенные исследования позволяют обосновать целесообразность обезболивающей и нейропротекторной терапии и повышения ее качества у больных рассеянным склерозом на фоне терапии глюкокортикоидами за счет создания фиксированных комбинаций лекарственных средств.

Ключевые слова: рассеянный склероз, экспериментальный аллергический энцефаломиелит, неопиоидные анальгетики, обезболивание, демиелинизация, нейропротекторы, адъювантная терапия.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

РС – розсіяний склероз;
ЕАЕ – експериментальний алергічний енцефаломієліт;
НПЗЗ – нестероїдні протизапальні засоби;
PGH-синтаза – простагландинсинтаза;
ПАФ – повний ад'ювант Фрейнда;
УРПУ – умовна реакція пасивного уникнення;
ЛП – латентний період;
 K_{Aa} – коефіцієнт антиамнестичної активності;
 $K_{ПБВ}$ – коефіцієнт переваги безпечного відсіку;
МДА – малоновий діальдегід;
СОД – супероксиддисмутаза;
АТФ – аденозинтрифосфат;
АДФ – аденозиндифосфат;
АМФ – аденозинмонофосфат;
МП – мітохондріальна пора;
 Ψ - мітохондріальний трансмембранний потенціал, мембранний заряд;
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;
РНК – рибонуклеїнова кислота;
М – метилпреднізолон;
ПОЛ – перекисне окислення ліпідів;
ЕГС – енцефалітогенна суміш;
ДЛМ – дихальний ланцюг мітохондрій;
АФК – активні форми кисню;
NO – оксид азоту;
iNOS – індукцибельна NO-синтаза.